

Kinetik von Protonentransferreaktionen an Bacteriorhodopsin– und CF₀F₁–ATP–Synthase–Lipidmembranen

Dem Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegte

Dissertation

eingereicht von
Diplom–Chemiker Dirk Rottschäfer
aus Detmold

Berichterstatter:	Prof. Dr. N. A. Dencher
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Martin
Tag der Einreichung:	09.08.1999
Tag der mündlichen Prüfung:	18.10.1999

Darmstadt 1999

D 17

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1995 bis Dezember 1996 in der Abteilung BENSC/NE am Hahn–Meitner–Institut Berlin GmbH und in der Zeit von Januar 1997 bis Juni 1999 am Institut für Biochemie im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. N. A. Dencher angefertigt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt *Prof. Dr. Norbert A. Dencher* für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und für seine Unterstützung und Anregungen bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Prof. Dr. Manfred Martin danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Beim *Graduiertenkolleg „Kinetik und Mechanismen von Ionenreaktionen“* möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken und für die Möglichkeit an interessanten Vorträgen und Diskussionen aus allen Bereichen der Chemie teilzunehmen.

Dr. Thomas Hauß und *Dr. Stephan A. W. Verclas* gilt mein herzlicher Dank für die Einführung in die Infrastruktur des Hahn–Meitner–Instituts Berlin GmbH und für die Einführung in die Blitzlicht–Spektroskopie, sowie für interessante und anregende Diskussionen fachlicher und nichtfachlicher Natur.

Bei *Christine Schröpfer* möchte ich mich für die Präparation der Purpurmembran und der delipidierten Proben der Purpurmembran bedanken. In positiver Erinnerung wird mir ihre Gesellschaft im Labor bleiben.

Der *Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert A. Dencher* danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Der *Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Oesterheld* danke ich für die Überlassung einer Probe der Bacteriorhodopsin–Mutante D36C.

Kerstin Siegmund gilt mein ganz besonderer Dank für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch in dieser Zeit und für ihre Hilfe beim Aufspüren und Beseitigen von Rechtschreibfehlern in der vorliegenden Dissertation.

Nicht zuletzt möchte ich *meine Eltern* erwähnen, die mir das Studium der Chemie ermöglichten und mich während der ganzen Zeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abkürzungsverzeichnis	4
3	Grundlagen und Kenntnisstand	6
3.1	Energietransduktion in biologischen Systemen	6
3.2	Modellsysteme zur Untersuchung der Protonentranslokation	7
3.3	Elektrisches Potential an Membranoberflächen	9
3.4	Detektion der Protonentranslokation	10
3.5	Optische pH-Indikatoren	11
3.6	Bacteriorhodopsin	13
3.6.1	Struktur von Bacteriorhodopsin	16
3.6.2	Photozyklus von Bacteriorhodopsin	18
3.7	Kinetische Absorptionsspektroskopie	22
3.8	CF _O F ₁ -ATP-Synthase	24
4	Ziele der Arbeit	27

5	Material und Methoden	28
5.1	Verwendete Chemikalien	28
5.2	Präparative Methoden	30
5.2.1	CF ₀ F ₁ -Präparation	30
5.2.1.1	Isolierung der Chloroplasten	30
5.2.1.2	Reduktion und Solubilisierung der ATP-Synthase	31
5.2.1.3	Ammoniumsulfatfällung	31
5.2.1.4	Dichtegradientenzentrifugation	31
5.2.2	Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen	33
5.2.2.1	Ultrazentrifugation	33
5.2.2.2	Acetonfällung	34
5.2.2.3	Extraktion mit Phenol / Ether	34
5.2.3	Solubilisierung von Bacteriorhodopsin	34
5.2.4	Herstellung von Lipidvesikeln	35
5.2.4.1	„Reverse Phase“-Methode	35
5.2.4.2	Beschall-Methode	36
5.2.5	Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Liposomen	36
5.2.5.1	Detergentsentfernung	37
5.2.5.2	„Freeze-Thaw“-Methode	37
5.2.6	Rekonstitution von ATP-Synthase in Liposomen	38

5.2.7	Korekonstitution von Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in Liposomen	39
5.2.7.1	Einschritt-Methode	40
5.2.7.2	Zweischritt-Methode	40
5.2.8	Teilweise Delipidierung der Purpurmembran	40
5.2.8.1	Delipidierung mit CHAPS	40
5.2.8.2	Delipidierung mit CHAPS und DDM	41
5.2.9	Abspaltung des Carboxyterminus von Bacteriorhodopsin	42
5.2.10	Markierung der Purpurmembran mit Fluoresceinderivaten	43
5.2.10.1	Markierung mit Fluoresceinsuccinimidylester	43
5.2.10.2	Markierung mit Fluoresceiniodacetamid	44
5.2.10.3	Nachweis des Markierungsgrades	45
5.2.11	Markierung von rekonstituierter ATP-Synthase	45
5.3	Analytische Methoden	47
5.3.1	Protein-Konzentrationsbestimmungen	47
5.3.2	Gelelektrophorese und Proteinfärbung	48
5.3.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
5.3.2.2	Coomassie-Blau-Färbung	50
5.3.2.3	Silberfärbung nach Oakley	50
5.3.3	Aktivitätsbestimmung der ATP-Synthase	51
5.3.4	Phosphatbestimmung	53

5.3.5	Messung der Protonentranslokation	53
5.3.5.1	Protonentranslokation ins wäßrige Medium	54
5.3.5.2	Protonentranslokation an der Oberfläche der Membran . .	55
5.3.5.3	Differenzbildung der transienten Absorptionsänderungen .	56
5.3.6	Absorptions- und Fluoreszenztitrationen	57
5.4	Datenauswertung	57
6	Ergebnisse und Diskussion	58
6.1	Aufbau des Blitzlicht–Absorptionsspektrometers	58
6.2	Ablauf der Messungen	64
6.3	Eigenschaften des Blitzlicht–Absorptionsspektrometers	65
6.3.1	Zeitliche Auflösung des Spektrometers	66
6.3.2	Signal–Rausch–Verhältnis	68
6.3.3	Leistung des Abtaststrahls	73
6.3.4	Temperierung der Probe	74
6.4	Pyranin und Carboxyfluorescein als pH–Indikatoren	76
6.4.1	Pyranin	76
6.4.2	Carboxyfluorescein	78
6.5	Differenzbildung zur Isolierung des Indikatorsignals	80
6.5.1	Einfluß der Anregungsenergie auf die Differenzbildung	81
6.5.2	Einfluß mobiler Puffer auf die Differenzbildung	86

6.6	Photozyklus und Protonentranslokation von nativer Purpurmembran . . .	89
6.7	Photozyklus und Protonentranslokation von Purpurmembran der Bacteriorhodopsin-Mutante D36C	94
6.7.1	Einfluß von Fluorescein auf den Photozyklus	96
6.7.2	Korrelation zwischen Photozyklus und Protonentranslokation	102
6.7.3	Kinetik der Protonentranslokation an Purpurmembran	107
6.8	Einfluß des Carboxyterminus auf Photozyklus und Protonentranslokation .	114
6.8.1	Einfluß des Carboxyterminus auf den Photozyklus	115
6.8.2	Einfluß von Fluorescein auf den Photozyklus	118
6.8.3	Protonentranslokation an Papain-verdauter Purpurmembran	119
6.9	Photozyklus und Protonentranslokation von delipidierter Purpurmembran .	125
6.9.1	Photozykluskinetik von delipidierter Purpurmembran	126
6.9.2	Kinetik des Protonentransfers an delipidierter Purpurmembran . . .	129
6.10	Photozyklus und Protonentranslokation von Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen	132
6.10.1	Kinetik des Photozyklus	137
6.10.2	Protonenaustausch zwischen Membran und wäßriger Phase	142
6.10.2.1	Abgabe der Protonen an das wäßrige Medium	142
6.10.2.2	Temperaturabhängigkeit der Protonenabgabe	145
6.10.2.3	Wiederaufnahme der Protonen aus dem wäßrigen Medium	147
6.10.3	Ionenstärkeabhängigkeit des Protonentransfers	149

6.10.4	Fluoreszenztitrations an Proteoliposomen	153
6.11	Protonentranslokation vom Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase in Vesikeln	157
6.11.1	Korekonstitution großer Anteile an Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in Lipidvesikel	159
6.11.2	Amplitude des Indikatorsignals	161
6.11.3	Markierung der korekonstituierten Vesikel	163
A	Bedienung des Steuerprogramms	165
A.1	Funktionen der Menüleiste	166
A.2	Steuerung mit Hilfe der Kommandozeile	169
A.2.1	Befehle analog zur Menüleiste	170
A.2.2	Erweiterte Befehle	170
A.3	Steuerung mit Hilfe der Stapelverarbeitung	172
A.4	Format der Konfigurationsdatei	172
A.5	Format der Ausgabedatei	174
B	Meßwerte	175
B.1	Photozyklus und Protonentranslokation von Purpurmbran der Bacteriorhodopsin-Mutante D36C	175
B.1.1	Photozykluskinetik	175
B.1.2	Kinetik der Protonentranslokation	177
B.2	Photozyklus und Protonentranslokation an Papain-verdauter Purpurmbran	178

B.2.1	Photozykluskinetik	178
B.2.2	Kinetik der Protonentranslokation	180
B.3	Photozyklus und Protonentranslokation an delipidierter Purpurmembran .	181
B.3.1	Photozykluskinetik	181
B.3.2	Kinetik der Protonentranslokation	182
B.4	Photozyklus und Protonentranslokation an Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen	183
B.4.1	Photozykluskinetik	183
B.4.2	Kinetik der Protonentranslokation	184
C	Komponenten des Blitzlichtspektrometers	187
D	Literatur	188

1 Zusammenfassung

Zur Detektion der Protonentranslokation an biologischen Membranen und zur Untersuchung des Photozyklus von Bacteriorhodopsin wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Blitzlicht–Absorptionsspektrometer aufgebaut. Mit diesem Spektrometer ist es möglich, Absorptionsänderungen einer Probe nach deren Anregung durch einen Laserblitz zeitaufgelöst aufzunehmen. Das Spektrometer zeichnet sich dabei sowohl durch eine große zeitliche Auflösung von 10 ns als auch durch eine hohe optische Auflösung von bis zu 0,1 mOD aus. Aufgrund der verwendeten Aufnahmeelektronik ist es möglich, einen Bereich von 10 ns bis 100 s in einem Meßzyklus aufzunehmen. Damit läßt sich in nur einer Messung ein Großteil der am Photozyklus beteiligten Prozesse aufnehmen, deren Zeitkonstanten von Femtosekunden bis Millisekunden reichen. Die an der Protonentranslokation beteiligten Schritte besitzen Zeitkonstanten im Bereich von Mikrosekunden bis Sekunden und sind ebenfalls vollständig mit einem Meßzyklus erfaßbar. Ein bestehendes Programm zur Steuerung für ein ähnliches Spektrometer wurde an die modifizierte Hardware angepaßt und um Funktionen erweitert, die es ermöglichen den Ablauf der Messungen weitgehend zu automatisieren. Am Blitzlicht–Absorptionsspektrometer wurden Kontrollmessungen durchgeführt, mit denen die zeitliche und optische Auflösung des Spektrometers bestimmt wurden.

Messungen der Kinetik der Protonentranslokation an der Purpurmembran der Bacteriorhodopsin–Mutante D36C (Austausch von Aspartat an Position 36 gegen Cystein) mit kovalent an das Protein gekoppelten pH–Indikatoren zeigten, daß vom Bacteriorhodopsin freigesetzte Protonen zunächst auf der extrazellulären Seite der Membran detektiert werden könnten. Auf dieser Seite der Membran befindet sich die Kanalöffnung des Bacteriorhodopsins, aus der die Protonen freigesetzt werden. Auf der entgegengesetzten, der zytoplasmatischen Seite der Membran, werden die Protonen nach der Freisetzung schneller detektiert als in der umgebenden wäßrigen Phase. Die Diffusion der Protonen um die Membran herum zur zytoplasmatischen Seite ist also schneller als der Austausch mit dem umgebenden wäßrigen Medium. Der Diffusionskoeffizient von Protonen an der Membranoberfläche ist etwa um den Faktor 60 kleiner als der Diffusionskoeffizient von Protonen in der wäßrigen Phase. Diese Ergebnisse stützen die lokalisierte Chemiosmotische Theorie der biologischen Energieumwandlung, nach der Protonen an einer Membran entlang der Oberfläche von einer Protonenpumpe zu einem Protonenverbraucher, wie z.B. der Chloroplasten–ATP–Synthase, diffundieren.

Durch Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von Photozyklus und Protonentranslokation im Bereich von 0 °C bis 60 °C konnte gezeigt werden, daß die Freisetzung der Protonen an der Oberfläche des Bacteriorhodopsins zwar während des Aufbaus des M-Intermediats des Bacteriorhodopsins geschieht, eine enge Kopplung zwischen einem einzelnen Prozeß im Photozyklus und der Protonenfreisetzung konnte aber nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurde für die Wiederaufnahme der Protonen durch das Bacteriorhodopsin eine strenge Korrelation mit dem letzten Prozeß im Zerfall des M-Intermediats festgestellt.

Eine kontrovers diskutierte Beteiligung des aus der zytoplasmatischen Seite der Purpurmembra n herausragenden carboxyterminalen Endes der Peptidkette an der Wiederaufnahme der Protonen in der zweiten Hälfte des Photozyklus, wurde untersucht, indem dieser Carboxyterminus durch die Protease Papain abgespalten wurde. Die Messung der Protonentranslokation an dieser modifizierten Purpurmembra n ergab, daß aus der Entfernung dieses Carboxyterminus nur eine geringfügig verringerte Geschwindigkeit der Wiederaufnahme von Protonen durch die Purpurmembra n resultiert. Eine grundsätzliche Beteiligung des Carboxyterminus an der Wiederaufnahme von Protonen aus der Lösung erscheint somit fraglich. Außerdem konnte an dieser Präparation gezeigt werden, daß die verzögerte Detektion der Protonen in der wäßrigen Phase nicht allgemeingültig ist. Bei Temperaturen oberhalb 40 °C konnten die Protonen bei dieser Präparation in der wäßrigen Phase mit der gleichen Geschwindigkeit detektiert werden wie an der extrazellulären Oberfläche der Membran.

Die Delipidierung, eine teilweise Entfernung der in der Purpurmembra n vorhandenen Lipide, stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Ladungsverteilung in der Umgebung des Bacteriorhodopsins zu verändern, ohne dessen Anordnung in einem 2D-Kristall aufzuheben. Es zeigte sich, daß die Verringerung der negativen Ladungen durch die Delipidierung einen erheblichen Einfluß auf die Protonentranslokation ausübt. So sind sowohl die Freisetzung von Protonen in die wäßrige Phase als auch die Wiederaufnahme der Protonen durch die delipidierte Purpurmembra n im Vergleich zur nativen Membran stark verzögert.

Messungen an einem rekonstituierten System, bei dem Bacteriorhodopsin in die Membran von Lipidvesikel eingebaut wurde, zeigten, daß sowohl die Kinetik des Photozyklus als auch der letzte Schritt der Protonentranslokation, die Wiederaufnahme der Protonen, von der Umgebung des Bacteriorhodopsins beeinflußt wird. Dabei wird die erste Hälfte

des Photozyklus durch die Lipide beschleunigt, während die zweite Hälfte des Photozyklus und die Wiederaufnahme der Protonen verzögert wird. Mit zunehmender Dichte negativer Oberflächenladung nähert sich die Kinetik des rekonstituierten Vesikelsystems der Kinetik von Bacteriorhodopsin in seiner natürlichen Umgebung, der Purpurmembran, an. Ein Einfluß der Lipidphase auf die Protonenfreisetzung in die wäßrige Phase konnte nicht gefunden werden. Auch eine vermutete Abhängigkeit der Kinetik der Protonentranslokation von der Ionenstärke der Lösung wurde nicht festgestellt.

Ein in vorhergehenden Arbeiten erstelltes System zur Detektion der Protonentranslokation vom Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase, bei dem Bacteriorhodopsin und Fluorescein-markierte Chloroplasten- CF_0F_1 -ATP-Synthase in Lipidvesikel korekonstituiert sind, konnte in seinen Eigenschaften so weit verbessert werden, daß es nun möglich erscheint, diese Protonentranslokation zu messen. Es konnte gezeigt werden, daß dafür große Mengen an Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in die Vesikel rekonstituiert werden müssen. Außerdem ist ein sehr hoher Markierungsgrad der ATP-Synthase nötig. Die Möglichkeit zur Messung der Protonentranslokation vom Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase an diesem System erscheint vielversprechend, konnte aber bislang im Rahmen dieser Arbeit noch nicht erfolgreich durchgeführt werden.

2 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BR	Bacteriorhodopsin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfat
DDM	β -D-Dodecylmaltosid
DMDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
DMF	Dimethylformamid
DMPA	Dimyristoylphosphatidsäure
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Phosphatidsäure aus Ei
EPC	Phosphatidylcholin aus Ei
FCR	Folin-Ciocalteus-Reagens
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fsucc	Fluoresceinsuccinimidylester
IAF	Iodacetamidofluorescein
MES	Morpholinoethansulfonsäure
OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
P	Phosphat
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
PCMBs	p-Chlorquecksilberbenzolsulfonat-Natriumsalz
PM	Purpurmembran
PS	Phosphatidylserin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricine	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Arg, R	Arginin
Asp, D	Aspartat
Cys, C	Cystein
Lys, K	Lysin
Trp, W	Tryptophan
D36C	D36C–Mutante der Purpurmembran
D36CV	Papain–verdaute D36C–Mutante der Purpurmembran
A_λ	Absorption bei der Wellenlänge λ
c	Konzentration
C_i	Konzentration der Ionensorte i
d	Schichtdicke
Da	Molekularmasse
E_a	Aktivierungsenergie
F	Faradaykonstante
G^0	Freie Enthalpie unter Standardbedingungen
k	Geschwindigkeitskonstante
OD_λ	optische Dichte bei der Wellenlänge λ
R	Gaskonstante
T	Temperatur
Z_i	Ladung der Ionensorte i
ε_0	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
ε_r	relative Dielektrizitätskonstante
ε_λ	dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
λ	Wellenlänge
σ	Oberflächenladungsdichte
τ	Zeitkonstante, Turbidität
Ψ	elektrisches Potential

3 Grundlagen und Kenntnisstand

3.1 Energietransduktion in biologischen Systemen

In biologischen Systemen wird der überwiegende Teil energieverbrauchender Prozesse durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P) angetrieben. Diese universelle biologische Energiequelle wird von den Organismen nicht aus der Umgebung aufgenommen, sondern von einem Proteinkomplex, der ATP-Synthase, in einer Umkehrreaktion der Hydrolyse synthetisiert. Die ATP-Synthase ist in eine Lipiddoppelschicht eingebaut und bezieht die benötigte Energie für diese endergonische Synthese ($\Delta G^0 = 30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, Stryer, 1990) aus einer Protonenkonzentrationsdifferenz und einer elektrischen Potentialdifferenz, die von anderen Proteinkomplexen über die Membran aufgebaut werden. Bei den Proteinkomplexen, welche dieses elektrochemische Potential über die Membran aufbauen, handelt es sich um Protonenpumpen, die räumlich getrennt von der ATP-Synthase in die gleiche Membran eingebaut sind (vgl. Abbildung 1).

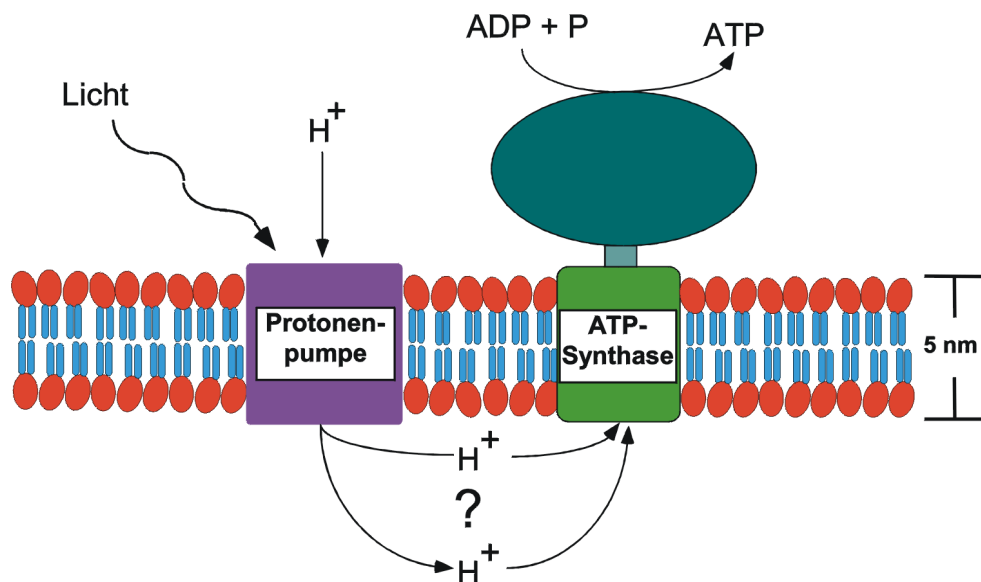


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Energietransduktion in biologischen Systemen.

Während die ATP-Synthase in allen Organismen einen ähnlichen Aufbau besitzt, handelt es sich bei den Protonenpumpen in den verschiedenen Klassen von Lebewesen um strukturell und funktionell stark unterschiedliche Proteinkomplexe: In Pflanzen bestehen diese

Protonenpumpen aus den Komplexen der Photosysteme I und II, die zusammen mit der ATP-Synthase in die Thylakoidmembran der Chloroplasten eingebaut sind. Bei Tieren dagegen stellen die Komplexe der Atmungskette die Protonenpumpen dar und befinden sich zusammen mit der ATP-Synthase in der inneren Membran der Mitochondrien. Halobakterien besitzen im Vergleich zu diesen Organismen eine sehr einfach aufgebaute Protonenpumpe, das Bacteriorhodopsin (BR). Bacteriorhodopsin ist ein einzelnes Protein, welches nach Absorption eines Lichtquants ein Proton durch die Plasmamembran befördert und damit die Energie zum Antrieb der ATP-Synthase bereitstellt.

Das in Abbildung 1 dargestellte Schema der Energietransduktion,



stellt somit ein ubiquitäres Motiv in der belebten Natur dar, welches erstmals von *Mitchell (1961)* in seiner Chemiosmotischen Theorie beschrieben wurde. Nach wie vor ist umstritten, inwiefern dabei ein Austausch der gepumpten Protonen mit der umgebenden wäßrigen Phase stattfindet. Als Extrema stehen sich hier die delokalisierte Chemiosmotischen Theorie von *Boyer et al. (1977)* und die lokalisierte Chemiosmotischen Theorie von *Williams (1978)* gegenüber: Nach der delokalisierten Chemiosmotischen Theorie equilibrieren die Protonen, nachdem sie durch die Membran gepumpt wurden, zunächst mit der umgebenden wäßrigen Phase und diffundieren dann durch die wäßrige Phase zur ATP-Synthase. Nach der lokalisierten Chemiosmotischen Theorie liegen Protonenpumpe und ATP-Synthase so dicht beieinander und arbeiten so schnell, daß die Protonen die Grenzschicht zwischen Membran und Wasser nicht verlassen. Nach der sogenannten mikrolokalisierten Chemiosmotischen Theorie von *Kell (1979)* existiert an der Membranoberfläche ein Netzwerk aus Wassermolekülen und Lipidkopfgruppen, welches es den Protonen ermöglicht, entlang dieses Netzwerkes von der Protonenquelle zum Protonenverbraucher zu diffundieren.

3.2 Modellsysteme zur Untersuchung der Protonentranslokation

Zur Untersuchung der Protonentranslokation und der Kopplung zwischen Protonenpumpe und ATP-Synthase eignen sich Modellsysteme, welche leicht darzustellen sind und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Die aus dem Modellsystem erhaltenen Ergebnisse sollten

außerdem auf die Gegebenheiten in lebenden Organismen übertragbar sein. Als Protonenpumpe für ein solches Modellsystem eignet sich dabei besonders das Bacteriorhodopsin, da es nur aus einer Untereinheit besteht und ein relativ kleines und stabiles Protein ist. Bacteriorhodopsin läßt sich leicht in großen Mengen aus einer Zucht von *Halobacterium salinarum* gewinnen. Als Protonenverbraucher kann die ATP-Synthase aus *Spinacia oleracea* verwendet werden. Diese ATP-Synthase ist ebenfalls nach etablierten Präparationsmethoden in großen Mengen zu gewinnen. Auf Struktur und Eigenschaften dieser Komponenten wird genauer in den Abschnitten 3.6 (BR) und 3.8 (ATP-Synthase) eingegangen.

Die Protonentranslokation wurde im Rahmen dieser Arbeit an unterschiedlichen Modellsystemen untersucht:

- Die **Purpurmembra**n (PM) (vgl. Abbildung 26, Seite 89) ist die natürliche Umgebung des Bacteriorhodopsins im *Halobacterium salinarum* (vgl. Abbildung 3, Seite 14).
- In **rekonstituierten Proteoliposomen** (vgl. Abbildung 46, Seite 135) ist das Bacteriorhodopsin aus seiner natürlichen Umgebung herausgelöst und in eine synthetische, sphärische Lipiddoppelschicht eingebettet.
- In **korekonstituierten Proteoliposomen** sind sowohl das Bacteriorhodopsin als auch die ATP-Synthase aus ihren natürlichen Umgebungen herausgelöst und zusammen in eine sphärische Lipiddoppelschicht eingebettet.

Bei allen oben aufgeführten Modellsystemen läßt sich eine Vielzahl von Parametern variieren, um deren Einfluß auf die Protonentranslokation zu untersuchen. Einige Systemparameter sind dabei für das benutzte Modellsystem spezifisch, während andere in allen untersuchten Systemen variiert werden können. Zu den Systemparametern, die in allen Systemen variabel sind, gehören der pH-Wert, die Temperatur, die Ionenstärke der wäßrigen Phase und die Intensität des Anregungsblitzes. Da in allen Systemen Bacteriorhodopsin enthalten ist, können in diesen Systemen die Auswirkungen von Modifikationen am Bacteriorhodopsin untersucht werden. Dazu zählen der Austausch einzelner Aminosäuren gegen andere, chemische Modifikationen an den Aminosäureseitenketten und die enzymatische Abspaltung des carboxyterminalen Restes von Bacteriorhodopsin. An der Purpurmembra läßt sich zusätzlich die Umgebung des Bacteriorhodopsins variieren, indem die

Lipide dieser Membran teilweise entfernt werden (Delipidierung). Bei der Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Lipidvesikel sowie bei der Korekonstitution von ATP-Synthase und Bacteriorhodopsin in Lipidvesikel werden die Proteine in zuvor aus Lipidmischungen hergestellte Vesikel eingebaut. Die Zusammensetzung der Lipidphase ist deshalb in diesen Systemen frei variierbar, was eine detaillierte Untersuchung des Einflusses der Lipide und besonders deren Ladung auf die Protonentranslokation und den Photozyklus ermöglicht. Da es sich bei den Proteoliposomen im Gegensatz zur Purpurmembran um ein geschlossenes System handelt, kann die Protonentranslokation außerdem durch Aufbau eines elektrochemischen Potentials unter Polarisierung der Membran untersucht werden.

3.3 Elektrisches Potential an Membranoberflächen

Die für die Protonentranslokation entscheidenden Eigenschaften der Membranoberfläche sind die Ladung der Membran, ihre Pufferkapazität und eine eventuell bestehende Potentialdifferenz zwischen beiden Seiten der Membran. Eine häufig benutzte Theorie zur Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Oberflächenladungsdichte, elektrischem Potential in der Nähe der Membranoberfläche und Konzentration geladener Teilchen im Übergangsbereich zwischen Membran und wässrigem Medium stellt die Gouy–Chapman–Theorie dar (McLaughlin, 1977; McLaughlin, 1989; Barber, 1980; Cevc, 1990; Walz, 1990). Die Gleichungen leiten sich dabei aus einer Kombination der Poisson–Gleichung und der Boltzmann–Verteilung ab.

Als zentrale Gleichung der Gouy–Chapman–Theorie erhält man dabei für die Oberflächenladungsdichte σ :

$$\sigma = \sqrt{2\varepsilon_r\varepsilon_0RT \sum_i C_{i,\infty} \left(e^{-\frac{Z_i F \Psi_0}{RT}} \right) - 1} \quad (2)$$

(ε_r : relative Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels, ε_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums, R : Gaskonstante, T : absolute Temperatur, C_i , Z_i : Konzentration und Ladung der Ionensorte i , Ψ : elektrisches Potential, x : Entfernung von der Membranoberfläche).

Für das elektrische Potential in einem beliebigen Abstand von der Oberfläche ergibt sich:

$$\chi \cdot x = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z_i F \Psi_0}{4RT} \right) \right] - \ln \left[\tanh \left(\frac{Z_i F \Psi_x}{4RT} \right) \right] \quad (3)$$

$$\text{mit } \chi = ZF \sqrt{\frac{2C_\infty}{RT\varepsilon_r\varepsilon_0}} \quad (4)$$

Um die Reichweite des elektrischen Potentials und damit die Dicke der diffusen elektrischen Doppelschicht abzuschätzen, kann die Debye-Länge l_D eingeführt werden:

$$l_D = \frac{1}{ZF \sqrt{\frac{2C_\infty}{RT\epsilon_r\epsilon_0}}} \quad . \quad (5)$$

Anschaulich gibt die Debye-Länge wieder, in welchem Abstand der Betrag des elektrischen Potentials Ψ auf $1/e$ seines Wertes am Ursprung abfällt. Die Debye-Länge ist umgekehrt proportional zur Ionenstärke. Bei geringen Salzkonzentrationen reicht das Potential weiter in die Lösung hinein als bei hohen Ionenstärken. Durch Einsetzen der Werte für die Naturkonstanten F , C und R in die Gleichung 5 erhält man bei 25 °C einen Wert für die Debye-Länge von:

$$l_D = 3,04 \cdot 10^{-10} \frac{1}{\sqrt{I}} \quad . \quad (6)$$

Für die in dieser Arbeit häufig verwendete Salzkonzentration von 150 mM KCl ergibt sich daraus eine Debye-Länge von 0,78 nm. Unter diesen Bedingungen ist die Dicke der diffusen Doppelschicht also bei weitem kleiner als die Dicke der Membran (~ 5 nm).

3.4 Detektion der Protonentranslokation

Protonen sind in wässriger Lösung schwer zeit- und orts aufgelöst nachzuweisen. Die im Labor am häufigsten eingesetzte Methode zur Messung des pH-Wertes, die pH-Elektrode, reagiert nur langsam auf Änderungen des pH-Wertes und besitzt nur eine sehr geringe Ortsspezifität. Zur Detektion der Protonentranslokation in den dargestellten Modellsystemen müssen daher Sonden in das System eingefügt werden, die eine zeitliche und räumliche Auflösung der Protonenbewegung ermöglichen. Hierzu eignen sich in wässriger Lösung optische pH-Indikatoren.

Die Änderung der lokalen Protonenkonzentration in der Umgebung des Indikators kann zeitaufgelöst über die Änderung der Absorptions- oder Fluoreszenzeigenschaften des Indikators nachgewiesen werden. Die Detektion der Absorptionsänderungen bietet dabei durch das größere absolute Lichtsignal den Vorteil der höheren zeitlichen Auflösung. Der Nachteil der Absorptionsspektroskopie besteht jedoch darin, daß im Vergleich zur Fluoreszenzspektroskopie höhere Konzentrationen des Indikators zur Detektion nötig sind.

Eine räumliche Auflösung der Protonentranslokation ist dadurch möglich, daß Indikatoren spezifisch an verschiedenen Stellen des Systems eingefügt werden. Neben dem Lösen

des Indikators in der wäßrigen Phase ist auch die spezifische kovalente Bindung eines Indikators an verschiedenen Aminosäureseitenketten des Bacteriorhodopsins (*Heberle & Dencher, 1992; Heberle et al., 1994*) und der ATP-Synthasen (*Middendorf, 1997*), sowie an die Kopfgruppen der Lipide möglich (*Heberle, 1991*).

3.5 Optische pH-Indikatoren

Optische pH-Indikatoren sind Farbstoffe, die mindestens eine saure oder basische Gruppe enthalten und deren Absorptionseigenschaften, sowie eventuell auch Fluoreszenzeigenschaften, vom Protonierungsgrad dieser Gruppen abhängen. Im einfachsten Fall handelt es sich dabei um einen Farbstoff, der eine protonierbare Gruppe enthält und bei dem der eine Protonierungszustand eine starke Absorptionsbande aufweist, während der andere Zustand das Licht in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbiert, weil die Absorptionsbande zu einer anderen Wellenlänge verschoben ist. In wäßriger Lösung gilt für das Verhältnis der Aktivitäten von protonierter $[IH]$ zu deprotonierter Form $[I^-]$ des Indikators das Massenwirkungsgesetz mit der Gleichgewichtskonstanten K_s . Die Gesamtaktivität des Indikators $[I_0]$ ergibt sich als Summe der protonierten und deprotonierten Form.

$$K_s = \frac{[I^-] \cdot [H^+]}{[IH]} \quad , \quad [I_0] = [IH] + [I^-] \quad (7)$$

Ersetzt man die Gleichgewichtskonstante durch den pK-Wert ($pK = -\log K_s$) und die Protonenkonzentration durch den pH-Wert ($pH = -\log [H^+]$), so gilt für die Aktivität der protonierten Form des Indikators:

$$[IH] = 10^{-pH} \cdot \frac{[I_0]}{10^{-pK} + 10^{-pH}} \quad (8)$$

und für die Aktivität der deprotonierten Form des Indikators:

$$[I^-] = 10^{-pK} \cdot \frac{[I_0]}{10^{-pK} + 10^{-pH}} \quad (9)$$

Die Absorption A_λ einer Indikatorlösung bei der Wellenlänge λ in Abhängigkeit vom pH-Wert ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz als Summe der Absorptionen der Einzelkomponenten in der Lösung mit dem dekadischen Extinktionskoeffizienten ε_λ und der Schichtdicke d .

$$A_\lambda = [I^-] \cdot \varepsilon_{I^-, \lambda} \cdot d + [IH] \cdot \varepsilon_{IH, \lambda} \cdot d \quad (10)$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 8 und 9 in Gleichung 10 erhält man den Zusammenhang zwischen der Absorption der Indikatorlösung und dem pH-Wert:

$$A_{\lambda}(pH) = [IH] \cdot d \cdot \frac{\varepsilon_{IH,\lambda} \cdot 10^{pK} + \varepsilon_{I^-, \lambda} \cdot 10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK}} \quad (11)$$

In Abbildung 2 ist die Abhängigkeit der Absorption eines Indikators von der Differenz zwischen dem pH- und dem pK-Wert dargestellt. Diese Abhängigkeit wird vom pK-Wert nur insofern beeinflusst, als daß der Wendepunkt der Kurve bei $pH = pK$ liegt. Die in Abbildung 2 dargestellte Kurve gilt deshalb für alle einbasigen Indikatoren.

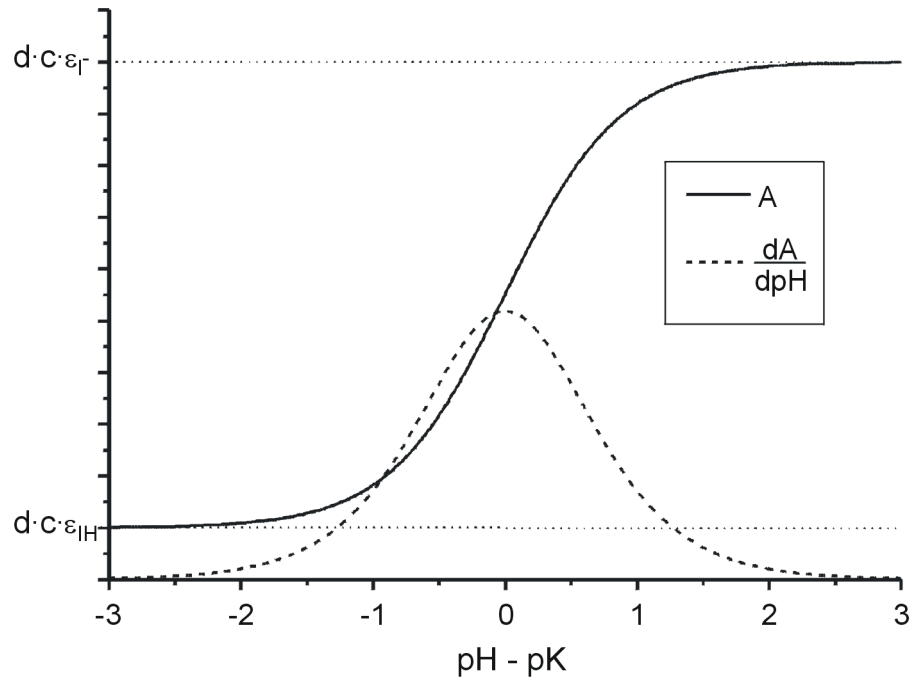


Abbildung 2: Absorption eines einbasigen Indikators in Abhängigkeit von der Differenz zwischen pH- und pK-Wert und Ableitung der Absorption nach dem pH-Wert.

Ein wichtiger Parameter für die Verwendung als pH-Indikator ist die Ableitung der Funktion 11 nach dem pH-Wert, also die Änderung der Absorption bei infinitesimaler Änderung des pH-Wertes. Dieser Wert gibt die Sensitivität des Indikators auf Änderungen des pH-Wertes wieder. Die Größe dieser Änderung ist proportional zur Differenz der beiden Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\lambda, I^-}$ und $\varepsilon_{\lambda, IH}$ und zur Konzentration des Indikators. Die größte Empfindlichkeit besitzt ein Indikator bei einem pH-Wert, der dem pK-Wert entspricht. Praktisch kann ein pH-Indikator in einem Bereich von $pH = pK \pm 1$ eingesetzt werden.

Daraus folgt, daß pH-Indikatoren, die in biologischen Systemen unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden, einen pK-Wert von etwa 7 haben sollten.

Der pK-Wert eines Indikators ist keine Konstante, sondern von Umgebungsbedingungen wie der Temperatur und der Ionenstärke der Lösung abhängig. Die Absorptionseigenschaften des Indikators werden von den Konzentrationen der protonierten und deprotonierten Form des Indikators bestimmt. In das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 7) gehen aber die Aktivitäten dieser beiden Spezies ein. Bei geladenen Teilchen hängt die Differenz zwischen Konzentration und Aktivität von der elektrostatischen Wechselwirkung der Teilchen mit ihrer Umgebung ab. Die attraktive Wechselwirkung zwischen einem geladenen Teilchen und der umgebenden Ionenwolke bewirkt, daß die Aktivität eines geladenen Teilchens in wäßriger Lösung immer kleiner ist als die Konzentration. Diese Differenz zwischen Aktivität und Konzentration ist um so größer, je stärker das Teilchen geladen ist und desto größer die Ionenstärke der Lösung ist. Da bei den meisten pH-Indikatoren die deprotonierte Form stärker geladen ist als die protonierte Form des Indikators, wird die deprotonierte Spezies in wäßriger Lösung durch die umgebenden Gegenionen besser stabilisiert. Die Differenz zwischen Aktivität und Konzentration nimmt daher für die stärker geladene Form des Indikators bei steigender Ionenstärke der Lösung stärker zu als für die weniger stark geladene Form. Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich daraus eine Abnahme des apparenten pK-Wertes mit steigender Ionenstärke der Lösung.

3.6 Bacteriorhodopsin

Bacteriorhodopsin ist ein integrales Membranprotein von *Halobacterium salinarum*, einem Vertreter der Archaeobakterien, welche neben den Eukaryonten und den Eubakterien ein eigenes Reich darstellen. Halobakterien leben in sehr warmen, extrem salzhaltigen Gewässern. Aufgrund dieser Bedingungen ist der Sauerstoffgehalt des Wassers so niedrig, daß ein oxidativer Stoffwechsel der Mikroorganismen in diesem Milieu oft nicht ausreicht, um deren Energiebedarf zu decken. Das *Halobacterium salinarum* bildet einen Photosyntheseapparat aus, der es ihm ermöglicht, Energie für den Stoffwechsel aus der Absorption von Sonnenlicht zu gewinnen. Der primäre Schritt bei dieser Energieumwandlung, die Absorption des Lichtes und die Umwandlung der Energie in einen elektrochemischen Gradienten, wird dabei vom Bacteriorhodopsin durchgeführt.

Über die Struktur und die Funktion von Bacteriorhodopsin ist bereits eine Anzahl von Übersichtsartikeln veröffentlicht worden (Dencher, 1983; Krebs & Khorana, 1993; Lanyi, 1993; Lanyi, 1997; Lanyi, 1998; Mathies et al., 1991; Oesterheld et al., 1992; Oesterheld, 1998; Stockenius, 1994; Stockenius, 1999).

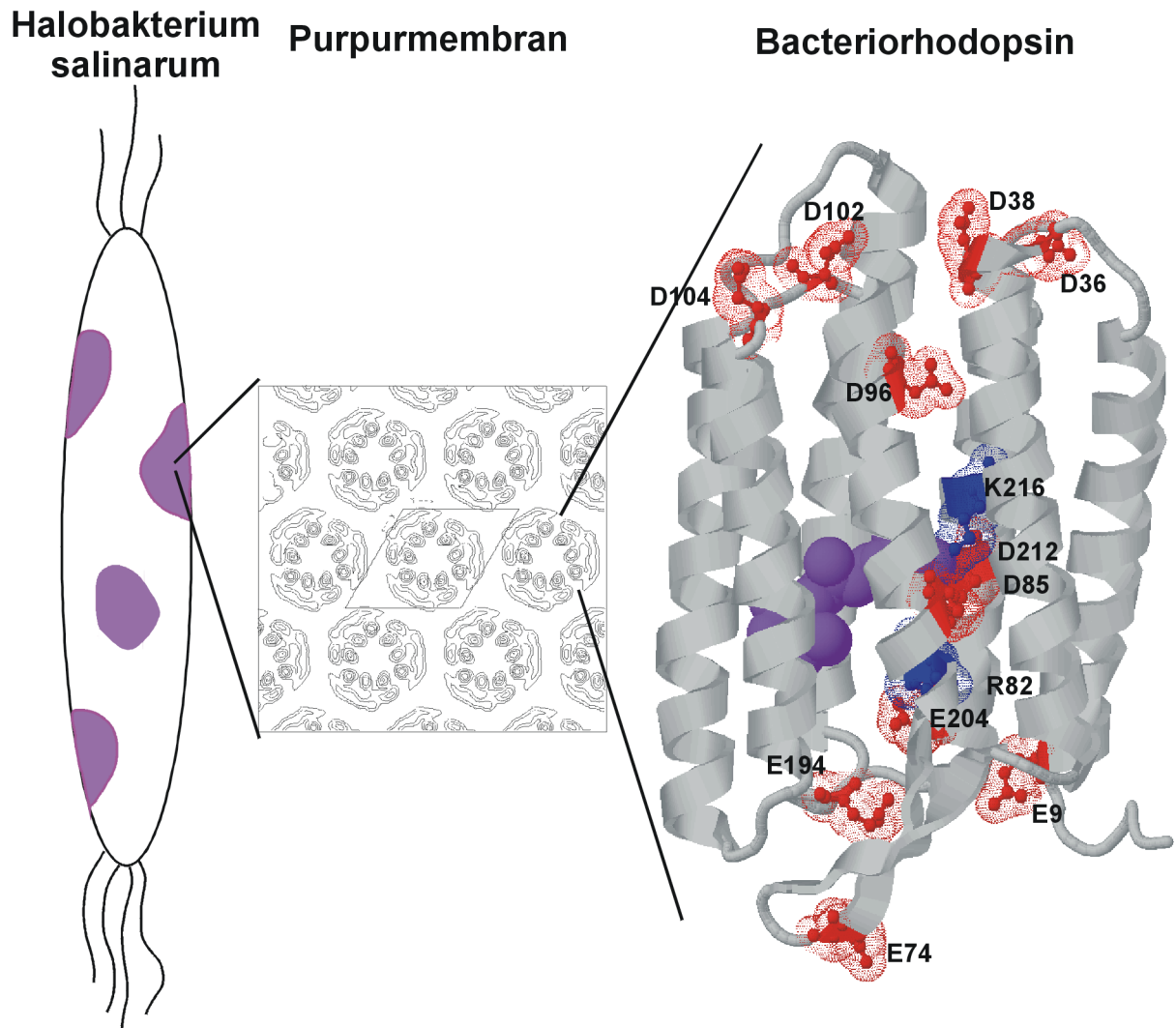


Abbildung 3: Schematische Darstellung von *Halobacterium salinarum*, Elektrodichteverteilung eines Ausschnitts der Purpurmembran in der Aufsicht und Bändermodell der Struktur von Bacteriorhodopsin in der Seitenansicht nach Kimura et al. (1997) (Proteindatenbankeintrag: 1at9). Die farbig hervorgehobenen Aminosäuren bezeichnen die Gruppen, die an der Protonentranslokation beteiligt sind. Blau symbolisiert basische Aminosäuren und Rot saure Aminosäuren. Das Retinal ist violett eingezeichnet.

Neben dem Bacteriorhodopsin wurden im *Halobacterium salinarum* noch drei andere Retinalproteine entdeckt, die dem Bacteriorhodopsin strukturell sehr ähnlich sind, aber ganz unterschiedliche Funktionen erfüllen: Halorhodopsin ist eine lichtgetriebene Chloridionenpumpe, die zur Regulation des osmotischen Drucks beiträgt. Sensorrhodopsin I und II sind Sensorproteine, die es dem Bakterium ermöglichen, optimale Lichtbedingungen aufzusuchen.

Das Bacteriorhodopsin findet sich in der Plasmamembran des Halobakteriums in purpurfarbenen, scharf abgegrenzten Arealen (Abbildung 3, links), die aufgrund ihrer Farbe als Purpurmembra (PM) bezeichnet werden. Wegen ihrer flickenhaften Verteilung in der Plasmamembran werden diese Areale auch als „Patches“ bezeichnet. Die Purpurmembra weist eine Dicke von 4,9 nm und eine laterale Ausdehnung von bis zu 1 μm auf. Das Bacteriorhodopsin ist das einzige Protein in diesen Bereichen und macht 75 % der Masse der Purpurmembra aus. Die restlichen 25 % der Masse entfallen auf Lipide, von denen etwa 10 pro BR-Molekül in der Membran enthalten sind. Das Bacteriorhodopsin ist in der Purpurmembra in einem starren, zweidimensionalen hexagonalen Gitter mit einer Gitterkonstanten von 62,5 Å angeordnet (Abbildung 3, Mitte). Eine Elementarzelle besteht dabei aus einem Trimer von Bacteriorhodopsin-Molekülen.

Die Lipide der Purpurmembra unterscheiden sich in ihrer Struktur von den Lipiden der Eukaryonten. Phosphoglyceride machen den größten Anteil der Lipide in Eukaryonten aus. Die Phosphoglyceride bestehen aus einem Glycerinrückgrat, das über Esterbindungen mit zwei Fettsäureresten verknüpft ist. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins ist über ein Phosphat mit einem Alkohol verbunden. Die Lipide der Purpurmembra hingegen bestehen nach *Kates et al. (1982)* zu etwa 25 % aus neutralen Komponenten, von denen Squalene und Retinal mit je etwa 10 % die größten Anteile ausmachen. Die übrigen 75 % der Purpurmembra lipide entfallen auf Phosphatidylglycerophosphate (PGP, 50 %), Phosphatidylglycerol (PG, 5 %), Phosphatidylglycerosulfat (PGP, 4 %), sowie auf Glycolipidsulfat (GLS, 7 %) und Triglycosyldiether (15 %). Die aliphatischen Seitenketten dieser Lipide bestehen aus Isoprenoiden und sind über Etherbindungen mit dem Glycerin verknüpft.

3.6.1 Struktur von Bacteriorhodopsin

Bacteriorhodopsin besitzt eine Molekularmasse des Apoenzyms (Protein ohne Retinal, Bacterioopsin) von 26784 Da und des Holoenzyms (Polypeptidkette und Retinal) von 27050 Da (*Hufnagel et al., 1996*). Bacteriorhodopsin besteht aus einer Polypeptidkette mit 248 Aminosäuren (*Ovchinkow et al., 1978; Khorana et al., 1979*). Die Primärstruktur wurde von *Dunn et al. (1981)* durch Sequenzierung des Gens nachträglich bestätigt. Die Peptidkette durchspannt die Membran in sieben α -Helices.

Die Struktur von Bacteriorhodopsin in der Purpurmembran ist mittlerweile in einer Auflösung von 3 Å (*Kimura et al., 1997*) (Abbildung 3) und kristallisiert in cubischer Phase in Auflösungen von 2,5 Å (*Pebay-Peyroula et al., 1997*) und 2,3 Å (*Luecke et al., 1998*) bekannt. In der Aufsicht auf die Membran sind die α -Helices des BR in zwei Bögen angeordnet, wobei ein innerer Bogen von den Helices B, C und D gebildet wird und ein äußerer Bogen von den Helices E, F, G und A (Abbildung 4). Zwischen diesen beiden Bögen befindet sich ein Transmembrankanale, der hauptsächlich von den Helices E, F, G und A gebildet wird. In der Mitte des Kanals ist ein Retinal als Chromophor lokalisiert. Das Retinal ist als protonierte Schiff'sche Base an Lysin 216 (Helix G) gebunden und teilt den Kanal in zwei Halbkanäle: Den extrazellulären und den zytoplasmatischen Halbkanal. Das Retinal ist in eine Bindungstasche eingebettet, die aus vier Tryptophan-Seitenketten gebildet wird, während die Aminosäuren D85, W86, R82 und D212 ein komplexes Gegenion zur Schiff'schen Base bilden.

Im Dunkeln relaxiert die Purpurmembran mit einer Halbwertszeit von 60 min (*Sperling et al., 1977*) zum dunkeladaptierten Grundzustand mit einem Absorptionsmaximum von 548 nm. Das Retinal liegt in diesem Zustand im Bacteriorhodopsin in einem Gemisch aus 13-*cis*-Retinal und all-*trans*-Retinal vor, wobei die Angaben über die Zusammensetzung dieses Gemisches von 1:1 (*Dencher et al., 1990*) bis 1:2 (*Scherrer et al., 1989*) reichen. Durch Absorption geht die Purpurmembran in den lichtadaptierten Zustand über, der ein Absorptionsmaximum bei 568 nm aufweist. In diesen Zustand liegt das Retinal ausschließlich in der all-*trans*-Konformation vor.

Aminosäureseitenketten bilden zusammen mit Wassermolekülen in den beiden Halbkanälen ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, welches den Transport von Protonen von der Proteinoberfläche zum aktiven Zentrum ermöglicht. Im extrazellulären Halbkanal sind

daran die Aminosäuren R82, D85 und E204 beteiligt, während im zytoplasmatischen Halbkanal die Seitenketten der Aminosäuren D96 und D38 diese Funktionen wahrnehmen.

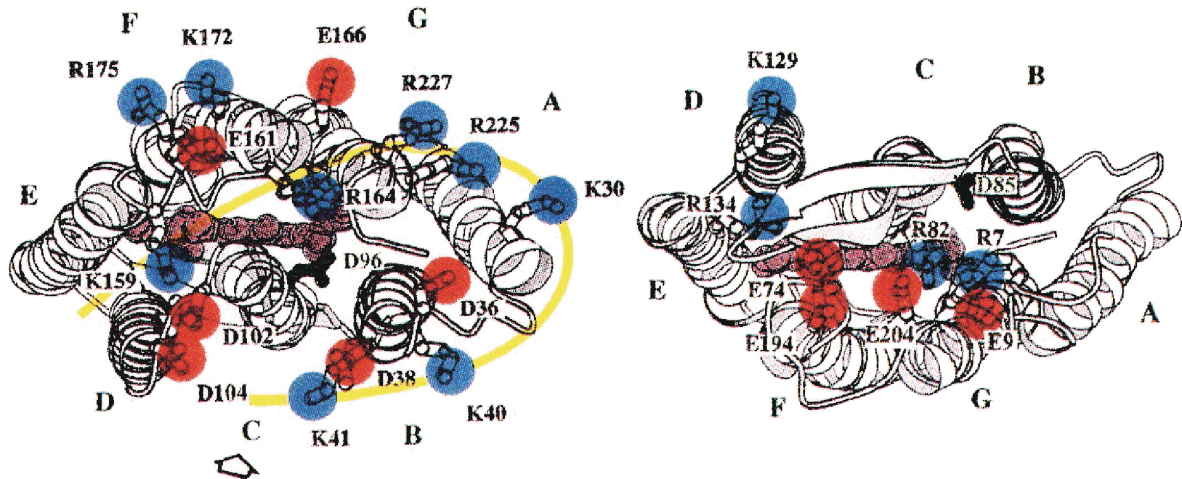


Abbildung 4: Verteilung der Oberflächenladungen auf der extrazellulären Seite (rechts) und auf der zytoplasmatischen Seite (links) des BR nach Kimura et al. (1997). Blaue Kreise symbolisieren basischen Aminosäure, rote Kreise saure Aminosäuren. Der primäre Protonendonator des Retinals (D96) und der primäre Protonenakzeptor (D85) sind zusätzlich in schwarz eingezeichnet.

Die Kanalöffnung ist auf der zytoplasmatischen Oberfläche des Bacteriorhodopsins von den negativ geladenen Aminosäuren D36, D38, D102 und D104 umgeben (Abbildung 4) (Kimura et al., 1997). Aufgrund des geringen Abstandes kooperieren die Aminosäuren D38, D102 und D104 in ihrer Attraktivität auf Protonen und wirken wie eine Antenne auf die Protonen des umgebenden Mediums und beschleunigen deren Aufnahme in den Kanal drastisch (Checover et al., 1997). Die Aminosäure D36 erfüllt die Funktion, die Protonen von der Antenne zur Öffnung des Kanals weiterzuleiten (Checover et al., 1997). Dieser Cluster aus negativ geladenen Aminosäuren ist von 7 positiv geladenen Aminosäuren eingekreist, die wiederum von negativ geladenen Lipiden umgeben sind.

Auf der extrazellulären Seite besitzt das BR eine weniger charakteristische Ladungsverteilung. Die Öffnung des Kanals ist auf dieser Seite von den positiv geladenen Aminosäuren R7, R82, R134 und K129 umgeben. Diese Aminosäuren bilden somit, im Gegensatz zur zytoplasmatischen Oberfläche, eine Kanalöffnung mit positivem Potential. Auch auf der zytoplasmatischen Seite des BR sind die positiv geladenen Aminosäuren der Kanalöffnung

von entgegengesetzt geladenen Aminosäuren und von den negativ geladenen Lipiden umgeben.

3.6.2 Photozyklus von Bacteriorhodopsin

Nach der Lichtabsorption durchläuft das Bacteriorhodopsin einen Reaktionszyklus thermischer Relaxationen, in dessen Verlauf ein Proton von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Membran befördert wird.

Um solch einen vektoriellen, durch Lichtenergie initiierten Pumpprozeß zu bewerkstelligen, muß das BR eine Reihe von grundlegenden Eigenschaften besitzen: Nach der Absorption eines Lichtquants durch den Chromophor Retinal muß zunächst die aufgenommene Energie konserviert werden, um die Emission eines Photons aus dem angeregten Zustand zu verhindern. Diese Stabilisierung muß schneller sein als die Lebensdauer des angeregten Zustandes. Im nächsten Schritt wird durch die Erniedrigung des pK-Wertes der protonierten Schiff'schen Base ein Proton über ein Netzwerk von Wassermolekülen und Aminosäureseitenketten zur extrazellulären Seite des Proteins abgegeben. Dabei muß sichergestellt sein, daß das Proton nur zur extrazellulären, nicht aber zur zytoplasmatischen Seite des Proteins gelangen kann. Als letzter Schritt kann nun ein Proton von der zytoplasmatischen Seite aufgenommen werden. Dazu muß sich der pK-Wert der Schiff'schen Base wieder erhöhen und sich gleichzeitig die Zugänglichkeit der Schiff'schen Base von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite des Proteins wechseln.

In Abbildung 5 ist ein Modell des Photozyklus und des Pumpvorganges nach Váró & Lanyi (1995) dargestellt, das aufgrund der Interpretation von Photozyklusmessungen aufgestellt wurde. Die einzelnen Intermediate im Verlauf des Photozyklus werden mit den Buchstaben J bis O bezeichnet. Die Indizes bezeichnen das Absorptionsmaximum des Intermediats. Das Modell geht von der Annahme aus, daß alle Übergänge zwischen den Intermediaten nach einer Kinetik 1. Ordnung verlaufen und mit Ausnahme der Übergänge von Intermediat M₁ zu M₂ und von O zu BR reversibel sind.

Nach der Absorption eines Lichtquants durch das Retinal bildet sich im Bereich von Femtoekunden das J-Intermediat, welches sich durch ein stark gespanntes Retinal in der all-*trans*-Konformation auszeichnet. Im Zeitbereich von Picosekunden isomerisiert das Retinal in die 13-*cis*-Konformation, ist aber zunächst noch stark verdreht (K-Intermediat)

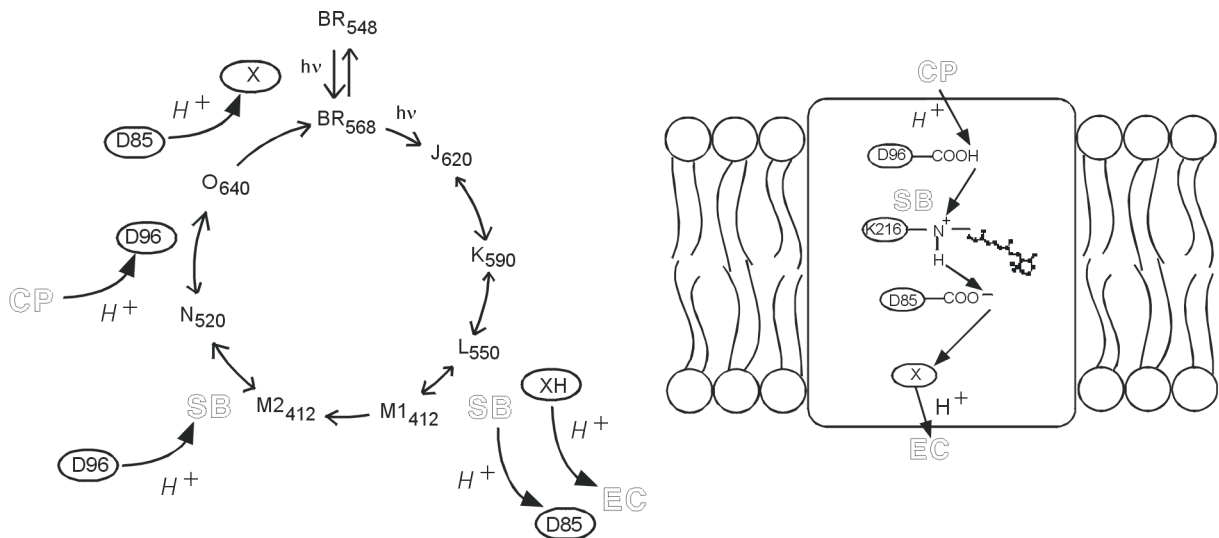


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Photozyklus und Pumpmechanismus von BR nach Váró & Lanyi (1995). (EC: extrazelluläre Kanalöffnung, CP: zytoplasmatische Kanalöffnung, SB: Schiff'sche Base)

und relaxiert mit einer Zeitkonstanten von ca. $1\ \mu\text{s}$ zu einer entspannten 13-*cis*-Konformation (L-Intermediat) (*Mathies et al., 1991*). Beim Übergang vom L-Intermediat zum M-Intermediat gibt die Schiff'sche Base ihr Proton an die Seitenkette der Aminosäure D85 ab. Diese Protonenübertragung ist möglich, da sich durch die Isomerisierung des Retinals der pK-Wert der Schiff'schen Base von über 13 im Grundzustand (*Druckmann et al., 1982*) auf ca. 3 im M-Intermediat (*Fischer & Oesterhelt, 1979*) erniedrigt. Der Übergang von M1 nach M2 wird als Reprotonierungsschalter des Bacteriorhodopsins postuliert (*Schulten & Tavan, 1990*) und ist somit für die Vektorialität des Pumpvorganges verantwortlich. Dabei kommt es im Photozyklus des Bacteriorhodopsins zu Konformationsänderungen in der Polypeptidkette, die für die Funktion des Bacteriorhodopsins wichtig sind (*Dencher et al., 1989; Koch et al., 1991; Saß et al., 1997*). Beim Übergang zum N-Intermediat findet die Reprotonierung der Schiff'schen Base durch Asp 96 statt (*Otto et al., 1989; Gerwert et al., 1989*). Die Reprotonierung der Schiff'schen Base wird erst dadurch ermöglicht, daß sich während dieses Überganges der pK-Wert auf über 11, dem pK-Wert von D96 erhöht (*Otto et al., 1989*). Beim Übergang zum O-Intermediats wird Asp 96 von der zytoplasmatischen Oberfläche des Proteins reprotoniert (*Cao et al., 1993*). Beim abschließenden Zerfall des O-Intermediats, der Relaxation zum Grundzustand, isomerisiert das Retinal zurück in die all-*trans*-Konformation und der Protonenakzeptor der Schiff'schen Base, das Asp 85, gibt das Proton an eine noch unbekannte Aminosäureseitenkette X ab (*Bousché et al., 1992*).

Durch die elektrostatischen Eigenschaften der Bindungstasche besteht eine starke Wechselwirkung mit der positiven Ladung der protonierten Schiff'schen Base, wodurch das Absorptionsmaximum des Retinals in Lösung von 370 nm zu 568 nm in der Bindungstasche von BR verschoben wird. Diese Rotverschiebung des Absorptionsmaximums ist allen Retinal-Proteinen eigen und wird als „Opsin-Shift“ bezeichnet. Aufgrund dieser starken Wechselwirkung zwischen dem Retinal und der Bindungstasche und der daraus resultierenden Auswirkungen auf die Absorptionseigenschaften des Retinals können Änderungen des Chromophors und in seiner Umgebung während der Reaktionskaskade mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Bereich verfolgt werden. Besonders stark ist dabei die Verschiebung des Absorptionsmaximums des M-Intermediats, bei dem die Schiff'sche Base deprotoniert vorliegt.

Die transienten Absorptionsänderungen, welche die Purpurmembran nach der Lichtanregung zeigt, sind in Abbildung 6 in einem dreidimensionalen Diagramm (links) und in einem Konturdiagramm (rechts) dargestellt. Da sich die Zeitkonstanten für die Übergänge zwischen den einzelnen Intermediaten über mehrere Dekaden erstrecken, sind die Absorptionsänderungen gegen eine logarithmische Zeitachse aufgetragen. Helle Flächen markieren eine Zunahme der Absorption, dunkle Flächen eine Abnahme der Absorption. Wie aus der Darstellung deutlich wird, erstrecken sich die Absorptionsänderungen im Photozyklus über den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums. Als markante Punkte treten dabei die Maxima bei 412 nm und 650 nm hervor, die den Intermediaten M, K und O zuzuordnen sind. Des weiteren erkennt man ein Minimum bei 570 nm, daß durch die Abnahme der Besetzung des Grundzustandes hervorgerufen wird. Die Absorptionsmaxima der übrigen Intermediate liegen so dicht am Absorptionsmaximum des Grundzustandes, daß sie nicht in den Diagrammen hervortreten. Aus der Erstreckung der transienten Absorptionsänderungen über das gesamte sichtbare Spektrum ergibt sich für die Untersuchung der Protonentranslokation mit Hilfe optischer pH-Indikatoren das Problem, daß das Indikatorsignal immer in einer Überlagerung mit dem Photozyklussignal erhalten wird (vgl. Abschnitt 6.5).

Das M-Intermediat, das aus den beiden Subzuständen M1 und M2 besteht, die im sichtbaren Bereich des Lichts absorptionsspektroskopisch praktisch nicht unterscheidbar sind, nimmt somit eine zentrale Rolle im Photozyklus des Bacteriorhodopsins ein. Wie in Abbildung 6 zu erkennen, ist das Absorptionsmaximum dieses Intermediats mit 412 nm gegenüber allen anderen Absorptionsmaxima sehr stark blauverschoben und damit spek-

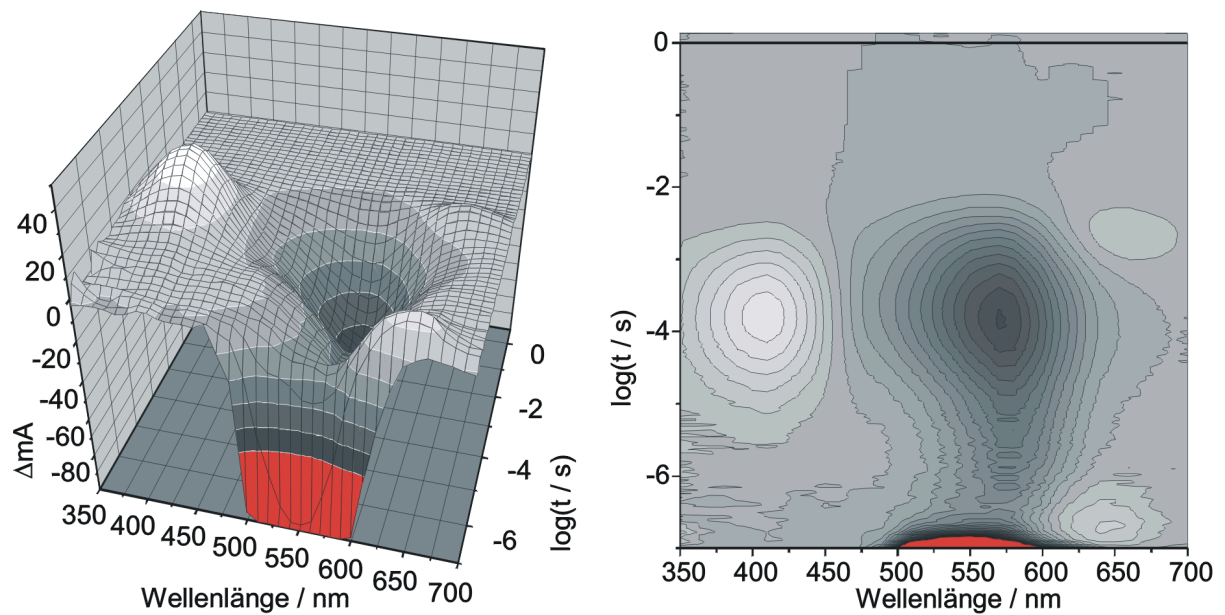


Abbildung 6: 3D-Diagramm (links) und Konturdiagramm (rechts) der transienten Absorptionsänderungen von Bacteriorhodopsin in der Purpurmembran während des Photozyklus (30°C, pH 7,1, 150 mM KCl). Die Absorptionsänderungen sind gegen eine logarithmische Zeitachse aufgetragen. Helle Flächen markieren eine Zunahme der Absorption, dunkle Flächen eine Abnahme der Absorption. Das Maximum bei 412 nm kann dem M-Intermediat zugeordnet werden, die Maxima bei 650 nm können dem K-Intermediat (bei $2 \cdot 10^{-7}$ s) und dem O-Intermediat (bei $7 \cdot 10^{-3}$ s) zugeordnet werden. Das Minimum bei 570 nm resultiert aus einer Abnahme der Besetzung des Grundzustandes. Die starke Abnahme der Absorption zwischen 500 nm und 600 nm im Zeitbereich kleiner $2 \cdot 10^{-7}$ s ist ein Artefakt, welches durch das Streulicht des Lasers hervorgerufen wird.

troscopisch gut zu untersuchen. Das in Abbildung 5 dargestellte Modell des Photozyklus zeigt außerdem, daß der Aufbau des M-Intermediats den Startpunkt der Protonenfreisetzung im Protein markiert. Der Zerfall des M-Intermediats zum N-Intermediat hingegen markiert den Startpunkt der Wiederaufnahme von Protonen von der zytoplasmatischen Seite der Membran.

3.7 Kinetische Absorptionsspektroskopie

Basierend auf dem Modell für den Photozyklus von Bacteriorhodopsin kann die Kinetik des Photozyklus mathematisch als konsekutive Reaktionen erster Ordnung beschrieben werden. Für eine Reaktionskaskade



gilt für die zeitliche Entwicklung der Konzentrationen der beteiligten Spezies nach *Rodiguin & Rodiguina (1980)*:

$$[A](t) = [A]^0 \cdot e^{-k_1 \cdot t} \quad (13)$$

$$[B](t) = [A]^0 \cdot \left[\frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_1 \cdot t} + \frac{k_1}{k_1 - k_2} e^{-k_2 \cdot t} \right] \quad (14)$$

$$\begin{aligned} [C](t) = [A]^0 \cdot & \left[\frac{k_1 \cdot k_2}{(k_2 - k_1) \cdot (k_3 - k_1)} e^{-k_1 \cdot t} + \frac{k_1 \cdot k_2}{(k_1 - k_2) \cdot (k_3 - k_2)} e^{-k_2 \cdot t} \right] \\ & + [A]^0 \cdot \left[\frac{k_1 \cdot k_2}{(k_1 - k_3) \cdot (k_2 - k_3)} e^{-k_3 \cdot t} \right] \end{aligned} \quad (15)$$

$$\begin{aligned} [D](t) = [A]^0 \cdot & \left[1 - \frac{k_2 \cdot k_3}{(k_2 - k_1) \cdot (k_3 - k_1)} e^{-k_1 \cdot t} + \frac{k_1 \cdot k_3}{(k_1 - k_2) \cdot (k_3 - k_2)} e^{-k_2 \cdot t} \right] \\ & + [A]^0 \cdot \left[\frac{k_1 \cdot k_2}{(k_1 - k_3) \cdot (k_2 - k_3)} e^{-k_3 \cdot t} \right] \end{aligned} \quad (16)$$

Da der Photozyklus des Bacteriorhodopsins aber aus mehr als vier Intermediaten besteht und zwischen diesen zusätzlich Rückreaktionen auftreten, ist die Kinetik des Photozyklus noch komplexer als die Kinetik der in Gleichung 12 dargestellten Reaktion. Das Beispiel der Beschreibung des zeitabhängigen Verlaufes der Konzentrationen der einzelnen Intermediate in den Gleichungen 13 bis 16 zeigt aber, daß eine Kaskade von Reaktionen erster Ordnung mit einer Summe aus Exponentialtermen beschrieben werden kann. Im Exponenten eines jeden Terms steht dabei nur die Geschwindigkeitskonstante eines beteiligten Reaktionsschrittes. In den präexponentiellen Faktor gehen hingegen jeweils mehrere Geschwindigkeitskonstanten ein. Bei unidirektionalen Reaktionen treten im präexponentiellen Faktor jedoch nur Geschwindigkeitskonstanten bis zu der Konstanten auf, die den

Zerfall des betrachteten Intermediats beschreibt. Treten Rückreaktionen von nachfolgenden Intermediaten auf, so gehen auch die Geschwindigkeitskonstanten dieser Prozesse in den präexponentiellen Faktor ein.

Unterscheiden sich die Intermediate einer solchen Reaktionskaskade in ihren Absorptionseigenschaften, dann läßt sich die Reaktion mit Hilfe der kinetischen Absorptionsspektroskopie verfolgen. Für die oben dargestellte Reaktionskaskade ergibt sich eine zeitabhängige Absorption $A_\lambda(t)$ von:

$$A_\lambda(t) = ([A](t) \cdot \varepsilon_{A,\lambda} + [B](t) \cdot \varepsilon_{B,\lambda} + [C](t) \cdot \varepsilon_{C,\lambda} + [D](t) \cdot \varepsilon_{D,\lambda}) \quad (17)$$

Durch Einsetzen der zeitabhängigen Konzentration der einzelnen Intermediate in diese Formel kann gezeigt werden, daß die transienten Absorptionsänderungen einer solchen Reaktionskaskade als eine Summe von Exponentialtermen dargestellt werden kann:

$$\Delta A(t) = \sum A_i e^{-k_i \cdot t} \quad (18)$$

In den präexponentiellen Faktor A_i gehen dabei nicht nur wie in Gleichung 13 bis 16 die Geschwindigkeitskonstanten ein, sondern zusätzlich die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Intermediate.

Der in Abbildung 5 (Seite 19) dargestellte Mechanismus des Photozyklus ist eine Modellvorstellung, die nicht für alle Bedingungen gilt unter denen der Photozyklus abläuft. So werden in der Literatur auch Parallelreaktionen und Verzweigungen im Photozyklus diskutiert (*Dencher & Wilms, 1975; Diller & Stockburger, 1988; Butt et al., 1989*). Auch die Energiedichte eines Anregungsblitzes, die Temperatur und der pH-Wert können Einfluß auf den Mechanismus des Photozyklus haben (*Dancsházy & Tokaji, 1993; Ablonczy et al., 1998; Szundi & Stockenius, 1989; Tokaji, 1993; Váró et al., 1996*). Unter verschiedenen Bedingungen können daher zur Anpassung der transienten Absorptionsänderungen unterschiedlich viele Exponentialterme nötig sein. Das bedeutet aber nicht, daß unter unterschiedlichen Bedingungen verschieden viele Intermediate im Photozyklus auftreten. Es handelt sich dabei vielmehr um ein Hilfsmittel, um den Photozyklus auch unter variierenden Bedingungen mit einem einfachen mathematischen Modell zu beschreiben.

Lichtinduzierte Reaktionen können mit Hilfe der Blitzlichtspektroskopie untersucht werden, die bereits 1950 von *Norrish & Porter* entwickelt wurde. Dabei wird die Reaktion

durch einen kurzen Lichtblitz gestartet und anhand der Absorption zeitaufgelöst verfolgt. Die zeitliche Auflösung einer solchen Spektroskopie hängt entscheidend von der Dauer des Lichtblitzes ab, mit dem die Reaktion gestartet wird. Während man früher bei Verwendung von Blitzlampen auf eine zeitliche Auflösung im μs -Bereich beschränkt war, hat die Anwendung von Lasern zur Anregung der Probe die Möglichkeiten dieser Spektroskopie drastisch erhöht. Bei Verwendung kommerzieller gütegeschalteter Laser erreicht man Auflösungen bis in den unteren ns-Bereich. Bei Verwendung ultrakurzer Laserblitze kann die Auflösung bis in den fs-Bereich gesteigert werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Blitzlichtspektrometer besteht in seinem Detektionsteil aus einem Einstrahlspektrometer. Optische Dichten, die sich als Quotient aus der Lichtintensität vor (I_0) und hinter (I) der Probe ergeben,

$$OD = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (19)$$

können damit nicht bestimmt werden, da die Lichtintensität vor der Probe (I_0) unbekannt ist. Es lassen sich deshalb nur zeitabhängige Differenzen der optischen Dichte ($\Delta OD(t)$) zur optischen Dichte bei einem Zeitpunkt t_0 bestimmen.

$$\Delta OD(t) = \log \left(\frac{I_{t_0}}{I(t)} \right) \quad (20)$$

Geht man davon aus, daß die Turbidität τ der Probe während der Messung konstant bleibt, kann die Änderung der optischen Dichte $OD = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d + \tau$ mit der Änderung der Absorption $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$ gleichgesetzt werden.

3.8 CF₀F₁–ATP–Synthase

ATPasen sind Proteinkomplexe, deren Aufgabe darin besteht, Transportvorgänge durch eine Membran hindurch mit der ATP–Synthese oder –Hydrolyse zu koppeln. Abhängig von ihrer Funktion werden die ATPasen in verschiedene Klassen eingeteilt. Die in dieser Arbeit benutzte Chloroplasten–ATP–Synthase aus Spinat gehört zur Klasse der F–ATPasen und wird nach ihrer Herkunft aus Chloroplasten als CF₀F₁–ATP–Synthase bezeichnet. Die Aufgabe der CF₀F₁–ATP–Synthase in den Chloroplasten besteht in der Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Die Energie, die für diese endergonische Reaktion nötig

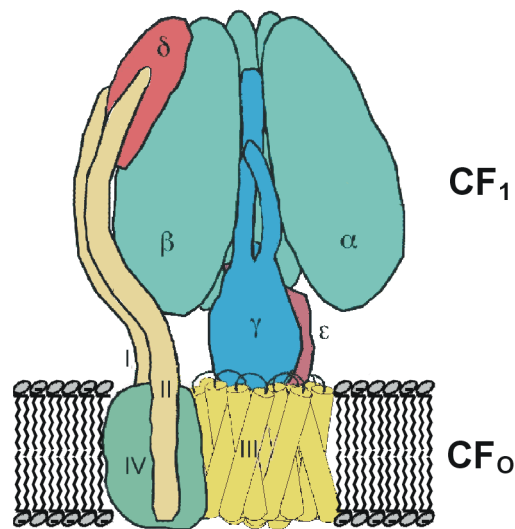


Abbildung 7: Strukturmodell der Chloroplasten ATP-Synthase nach Engelbrecht & Junge (1997). (CF_0 : membranintegroaler, hydrophober Komplex; CF_1 : hydrophiler Komplex)

ist, bezieht die ATP-Synthase aus einem elektrochemischen Potential und einer Protonenkonzentrationsdifferenz, die von den Komplexen des Photosyntheseapparates über die Membran aufgebaut werden.

Die CF_0F_1 -ATP-Synthase ist ein Proteinkomplex, der aus neun verschiedenen Untereinheiten besteht und eine Molekularmasse von etwa 560 kDa besitzt. Ein schematisches Modell der CF_0F_1 -ATP-Synthase ist in Abbildung 7 dargestellt. Der Proteinkomplex gliedert sich in zwei Subkomplexe, den membranintegroalen, hydrophoben CF_0 -Komplex und den in das Zytosol ragenden, hydrophilen CF_1 -Komplex.

Der CF_0 -Komplex besteht aus den Untereinheiten I, II, IV und 9 bis 12 Kopien der Untereinheit III (Fromme et al., 1987). Nach dem Modell von Engelbrecht & Junge (1997) bilden die Kopien der Untereinheit III eine ringförmige Struktur in der Membran aus, an welche die Untereinheit IV seitlich angelagert ist. Diese Untereinheit ist zusammen mit den 9 bis 12 Kopien der Untereinheit III für die Protonenleitung verantwortlich. An die Untereinheit IV angelagert befinden sich die beiden Untereinheiten I und II, die aus der Membran herausragen und eine Verbindung zum hydrophilen Kopfteil des Proteinkomplexes herstellen. Eine Kristallisation des CF_0 -Komplexes und damit verbunden eine hochauflösende Strukturuntersuchung an diesem Komplex ist bisher nicht gelungen.

Der hydrophile CF_1 -Komplex wird aus den Untereinheiten α bis ε gebildet (*McCarty & Hammes, 1987*), wobei die Untereinheiten α und β in je drei Kopien vorliegen und alternierend in einer hexagonalen Struktur angeordnet sind. Dieses Hexamer besitzt drei Nucleotid-Bindungsstellen und ist für die katalytischen Eigenschaften der ATP-Synthase verantwortlich. Die Untereinheit γ bildet einen Stiel aus, der sich im Zentrum der α - und β -Einheiten befindet und mit den Kopien der Untereinheit III im CFO -Teil des Komplexes verbunden ist. Die Untereinheit γ stellt das Bindeglied zwischen den aus der Membran herausragenden Untereinheiten I und II und dem CF_1 -Teil des Komplexes dar. Die Untereinheit ε steht in Kontakt mit den Untereinheiten β , γ und III. Eine Röntgenstruktur ist bisher nur für einen Komplex $\alpha_3\beta_3\gamma$ erhalten worden (*Abrahams et al., 1994*). Dies wurde unter anderem mit dem Nobelpreis in Chemie für J.E. Walker und P.D. Boyer gewürdigt.

Nach dem Modell von *Engelbrecht & Junge (1997)* bewirkt der Protonenfluß eine Drehbewegung der ringförmig angeordneten Untereinheiten III relativ zur Untereinheit IV. Diese Drehbewegung wird auf die Untereinheit γ im CF_1 -Komplex übertragen, was zu einer zyklischen Konformationsänderung in den Untereinheiten α und β führt und damit die treibende Kraft für die ATP-Synthese darstellt. Der energieaufwendige Schritt ist dabei nicht die Synthese des ATP selbst, sondern das Austreiben des ATP aus der Bindetasche des Proteins. Die Untereinheiten I und II, welche die Untereinheit IV mit dem CF_1 -Teil verbinden, stellen den Stator dieses Systems dar. Die Rotation der Untereinheit γ relativ zum $\alpha_3\beta_3$ -Komplex bei der ATP-Hydrolyse konnte durch die Bindung eines Fluoreszenzmarkierten Filaments an die γ -Untereinheit visualisiert werden (*Noji et al., 1997; Sabbert et al., 1996*).

4 Ziele der Arbeit

Zur Untersuchung von Protonentranslokation und Photozyklus von Bacteriorhodopsin sollte aus Einzelkomponenten ein kinetisches Blitzlicht-Absorptionsspektrometer nach dem Vorbild einer bestehenden Anlage am Hahn-Meitner-Institut Berlin GmbH aufgebaut werden. Da die zur Verfügung stehenden Komponenten nicht mit denen des Spektrometers am Hahn-Meitner-Institut identisch waren, sollte auch das bestehende Programm zur Steuerung dieser Anlage an die veränderten Komponenten angepaßt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß der Übergang von Protonen von der Oberfläche der Purpurmembran in das umgebende wäßrige Medium sehr viel langsamer verläuft, als es nach einem rein diffusiven Mechanismus erwartet werden kann. Um das Verständnis für diese verzögerte Freisetzung der Protonen in die wäßrige Phase zu vertiefen, sollte die Protonentranslokation an Bacteriorhodopsin-Systemen mit modifizierter Membranoberfläche untersucht werden. Als Möglichkeiten zur Modifizierung boten sich dabei sowohl Variationen der Lipidumgebung des Bacteriorhodopsins (Delipidierung, Rekonstitution in Lipidvesikel) an, als auch Veränderungen am Protein selbst (Entfernung des Carboxyterminus).

Durch Untersuchung der Detektionszeiten für Protonen auf beiden Seiten der Purpurmembran kann die Dauer ermittelt werden, welche die Protonen benötigen um von der ein Seite der Membran zur anderen zu diffundieren. Aus dieser Dauer kann bei bekannter Wegstrecke auf die Diffusionsgeschwindigkeit von Protonen entlang einer Membranoberfläche geschlossen werden. Der Wert für die Diffusionskonstante ist in der Literatur umstritten. Die Messung der Protonentranslokation auf beiden Seiten der Purpurmembran sollte daher Aufschluß über die Geschwindigkeit der Diffusion von Protonen an der Oberfläche der Purpurmembran bringen.

Ein von *Middendorf (1994)* entwickeltes System zur Untersuchung des Protonentransfers von der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin zum Protonenverbraucher CF_0F_1 -ATP-Synthase in korekonstituierten Proteoliposomen war bisher aufgrund seiner Eigenschaften nicht zur Messung mit der Blitzlicht-Spektroskopie geeignet. Durch Modifikationen sollte dieses System der Untersuchung der Protonentranslokation mit Hilfe der Blitzlicht-Spektroskopie zugänglich gemacht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Chemikalien

Acryl-/ Bisacrylamid 29:1 (40 % wäßrige Lösung)	Appligene, Heidelberg
Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	Sigma, Deisenhofen
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka, Neu-Ulm
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Asolectin aus Sojabohne	Fluka, Neu-Ulm
ATP Monitoring Kit	Bio Orbit, Turku (Finland)
Bernsteinsäure	Sigma, Deisenhofen
Bio-Beads SM [®] 2, 20 – 50 mesh	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
p-Chlorquecksilberbenzolsulfonat-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]- propansulfat (CHAPS)	Calbiochem
Coomassie [®] Brilliant Blue R250	Fluka, Neu-Ulm
Cystein·HCl·H ₂ O	Serva, Heidelberg
β -D-Dodecylmaltosid	Calbiochem
Dimethyldioctadecylammoniumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphat (DMPA)	Fluka, Neu-Ulm
1,2-Dimyristoyl-sn-phosphatidylcholin (DMPC)	Fluka, Neu-Ulm
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetatdinatriumsalz·2H ₂ O (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fluoresceinisothiocyanat 10 % an Celite [®] (FITC)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Fluoresceinmaleinimid (Fmal)	Molecular Probes, Eugene (USA)
6-(Fluorescein-5(6)-succinimidylester (Fsucc)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Formaldehyd 35 %ig	Roth, Karlsruhe
Glycin	Appli Chem, Darmstadt
Gramicidin aus <i>Bazillus brevis</i>	Fluka, Neu-Ulm
8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure- Trinatriumsalz (Pyranin)	Lambda, Graz (Österreich)
Imidazol	Merck, Darmstadt

5-Iodoacetamidofluorescein (IAF)	Molecular Probes, Eugene (USA)
Kaliumchlorid p.A.	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat p.A.	Roth, Karlsruhe
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat p.A.	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat p.A.	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Molekulargewichtsstandard LMW 14,4 – 94 kD	Pharmacia, Freiburg
2-N-Morpholino-ethansulfonsäure (MES)	Appli Chem, Darmstadt
Natriumacetat p.A.	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumtetraborat p.A.	Merck, Darmstadt
di-Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumcholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat p.A.	Fluka, Neu-Ulm
Natriumsuccinat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat p.A.	Merck, Darmstadt
n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG)	Sigma, Deisenhofen
Papain	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidsäure aus Eigelb (EPA)	Lipoid, Ludwigshafen
Phosphatidylcholin-L-a Lecitin aus Eigelb (EPC)	Sigma, Deisenhofen
3-sn-Phosphatidylserin aus Rinderhirn (PS)	Fluka, Neu-Ulm
Purpurmembran aus <i>H. salinarum</i> [S9] (PM)	Eigenzucht
Roti [®] -Collect I	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Collect II	Roth, Karlsruhe
rotiphorese [®] Gel A	Roth, Karlsruhe
rotiphorese [®] Gel B	Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Sephadex G 50	Pharmacia, Freiburg
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Spinat (frisch)	Einzelhändler, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Biomol, Hamburg
N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Boehringer, Mannheim
Valinomycin	Boehringer, Mannheim

5.2 Präparative Methoden

5.2.1 CF₀F₁-Präparation

Die Chloroplasten-ATP-Synthase wird aus Spinat nach einer Vorschrift von *Pick & Racker (1979)* isoliert, die von *Fromme et al. (1987)*, *Middendorf (1997)* und *Neff (1998)* modifiziert wurde. Nach dem Isolieren der Chloroplasten aus den Spinatblättern wird die ATP-Synthase mit Hilfe von Detergens aus der Thylakoidmembran herausgelöst und nach einer Dichtegradientenzentrifugation mit zugefügtem Asolectin als Protein-Asolectin-Triton X-100 Micelle erhalten.

Alle Arbeiten der Isolierung sollten möglichst rasch und bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt werden. Zusätzlich sollten alle verwendeten Lösungen und die Rotoren vorgekühlt werden. Eine Lagerung des Spinats über Nacht bei 4 °C verringert den Stärkegehalt der Blätter, was sich günstig auf die Reinheit der Präparation auswirkt (*Middendorf, persönliche Mitteilung*). Alle Mengenangaben beziehen sich auf die Präparation von 2 kg vorsortiertem Blattmaterial.

5.2.1.1 Isolierung der Chloroplasten

Die Spinatpflanzen werden kalt gewaschen und beschädigte Blätter aussortiert. Anschließend werden die Blattrippen abgetrennt und 2 kg des Blattmaterials in einem Haushaltsmixer mit 2,8 l Puffer I homogenisiert. Beim Pressen des Homogenisats durch eine zweilagige Nylongaze (80 µm Maschenweite innen, 20 µm außen) werden größere Bestandteile abgetrennt. Durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 8650 g (Sorvall RC 5B, GS-3 Rotor, 7000 U min⁻¹, 4 °C) werden die Chloroplasten sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes werden die Sedimente in 10 ml Puffer I suspendiert. Mit Hilfe von Aceton kann das Chlorophyll aus dieser Suspension extrahiert, und dessen Konzentration spektralphotometrisch bestimmt werden. Dazu werden 40 µl der Suspension mit 10 ml 80 %igem Aceton 30 s geschüttelt und mit einem Papierfilter abfiltriert. Die Chlorophyllkonzentration läßt sich aus den ermittelten Absorptionen bei 663 nm und 645 nm nach folgender Formel berechnen:

$$c = 5,56 \cdot A_{645} + 2,27 \cdot A_{663} \text{ [mM]} \quad (21)$$

Durch Verdünnen der Suspension mit Puffer I wird die Chlorophyllkonzentration auf 8 mM eingestellt. Das Volumen der Suspension sollte dabei 100 ml nicht überschreiten.

5.2.1.2 Reduktion und Solubilisierung der ATP-Synthase

Die ATP-Synthase wird unter reduzierenden Bedingungen mit dem Detergens n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (OG) aus der Chloroplastenmembran herausgelöst. Dazu gibt man zu der Chloroplastenmembran festes 1,4-Dithiothreitol (DTT), so daß sich eine Konzentration von 50 mM ergibt und rührt die Suspension 15 min bei 4 °C. Nach Zugabe des gleichen Volumens Solubilisierungsmediums Puffer III wird weitere 15 min bei 4 °C gerührt. Durch einstündiges Zentrifugieren bei 208000 g (Beckman L8, Ti-60, 45000 U min⁻¹, 4 °C) werden nicht-solubilierte Chloroplastenbestandteile sedimentiert. Das Sediment der Zentrifugation wird verworfen.

5.2.1.3 Ammoniumsulfatfällung

Zur weiteren Aufreinigung wird der Überstand der Zentrifugation einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Die Fällung wird in zwei Stufen von 20 % und 40 % Ammoniumsulfat durchgeführt. Dazu wird tropfenweise eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung unter starkem Rühren der Lösung zugegeben. Das zuzugebende Volumen der Ammoniumsulfatlösung wird nach folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{V(B - A)}{100\% - B} \quad (22)$$

x: Volumen der Ammoniumsulfatlösung V: Volumen der Suspension

A: Anfangskonzentration

B: Endkonzentration

Anschließend läßt man die Lösung 20 min ohne Rühren stehen und sedimentiert den Niederschlag in 10 min bei 12000 g (Sorvall RC 5B, SS-34 Rotor, 10000 U min⁻¹, 4 °C). Das Sediment der ersten Fällung wird verworfen. Vor der zweiten Zentrifugation wird die Lösung leicht aufgerührt, um den Niederschlag möglichst quantitativ in die Zentrifugenbecher zu überführen. Nach der Sedimentation wird der zweite Niederschlag sorgfältig vom Überstand getrennt und in 2 ml Puffer IV gelöst. Wenn die Dichte dieser Lösung größer ist als die der oberen Stufe des Dichtegradienten, muß die Lösung mit Puffer IV verdünnt werden, damit sie bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation nicht in den Gradienten einsinkt.

5.2.1.4 Dichtegradientenzentrifugation

Das erhaltene Rohprodukt der ATP-Synthase aus der Ammoniumsulfatfällung kann durch

eine Saccharose-Stufenzentrifugation weiter aufgereinigt werden. Eingesetzt werden Stufen von 12,75 %, 18,5 %, 24,25 %, 30,0 % und 40,0 % Saccharose (w/v) in Puffer IV, der zusätzlich Asolectin zur Stabilisierung des Proteins in einer Konzentration von 1 mg/ml enthält. Je 7,5 ml der Lösungen mit den verschiedenen Saccharosekonzentrationen werden in einem Zentrifugenröhrchen unterschichtet, indem zunächst die Lösung mit der geringsten Saccharosekonzentration durch eine Kanüle auf den Boden des Röhrchens geleitet wird. Beim nachfolgenden Befüllen mit den Lösungen der jeweils nächst größeren Saccharosekonzentrationen durch die Kanüle werden die darüber befindlichen Schichten geringerer Dichte angehoben. Auf die obere Schicht wird dann die Proteinelösung aufgetragen, die vorher so verdünnt wurde, daß sie nicht in diese Schicht absinkt. Nach 16 h Zentrifugieren in einem Schwingbecherrotor bei 125500 g (Beckman L8, VTI-50, 36000 U min⁻¹, 4 °C) befindet sich die ATP-Synthase in einer gelblich gefärbten Bande im Bereich der 30 %igen Saccharose-Stufe. Durch seitliches Einstechen der Zentrifugenröhrchen mit einer Kanüle in Höhe der Bande der ATP-Synthase kann das Protein entnommen und nach Bestimmung von Volumen und Proteinkonzentration der Lösung bei -20 °C gelagert werden.

Verwendete Pufferlösungen

Die Mengen beziehen sich auf die Präparation von 2 kg Spinat. Die pH-Werte der Lösungen werden mit Natronlauge eingestellt.

Puffer I, 3 l, pH 8,0

20 mM Tricin
400 mM Saccharose
5 mM MgCl₂
100 µM Na-PCMBS

Puffer II, 1 l, pH 8,0

10 mM Tricin
2,5 mM MgCl₂
100 µM Na-PCMBS

Puffer III, 250 ml, pH 8,0

20 mM Tricin
400 mM Saccharose
5 mM MgCl₂
400 mM (NH₄)₂SO₄
0,2 mM Na₂-ATP
1 % (w/v) Na-Cholat
60 mM OG
50 mM DTT

Puffer IV, 200 ml, pH 6,5

60 mM Tris/HCl
60 mM Na-Succinat
0,4 mM Na₂-ATP
1 mM Na-EDTA
0,4 % (w/v) Triton X-100

Gradientenmedium 40 %, pH 6,5

100 g Saccharose in 125 ml Puffer IV, aufgefüllt mit dest. Wasser auf 250 ml

Ammoniumsulfatlösung, pH 8,0

50 ml bei 4 °C gesättigte Ammoniumsulfatlösung (4,1 M bei 24 °C, 3,9 M bei 0 °C
Cooper, 1981)

Asolectin-Lösung

280 mg Asolectin in 7 ml dest. Wasser, suspendiert durch 20 minütige Behandlung
im Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin)

5.2.2 Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen

Aus der Dichtegradientenzentrifugation wird die ATP-Synthase in einer Konzentration von ca. 2 – 5 mg/ml gewonnen. Da für die Messung der Protonentranslokation sehr viel ATP-Synthase in die Vesikel rekonstituiert werden muß und die Lösungen eine hohe Vesikelkonzentration aufweisen sollen, ist es günstig, die Konzentration der ATP-Synthase vor der Rekonstitution zu erhöhen. Diese Proteinanreicherung kann durch eine Ultrafiltration erreicht werden. Für die gelelektrophoretische Analyse der Proteine in den rekonstituierten Vesikeln ist es ebenfalls nötig, vorher die Proteinkonzentration zu erhöhen. Außerdem wirkt sich die Entfernung des Lipidanteils in den Proben günstig auf das Laufverhalten der Proteinbanden aus. Für die Analyse eignen sich daher Proteinfällungen mit Aceton oder Phenol / Diethylether.

5.2.2.1 Ultrazentrifugation

Für die Anreicherung der ATP-Synthase werden Centriprep-30-Konzentratoren verwendet. Diese haben ein Fassungsvermögen von 15 ml und können für die Konzentrierung von Stoffen mit einer relativen Molekularmasse > 30000 Da benutzt werden. Nach dem Befüllen des Konzentrators wird dieser 4 h bei 3000 g zentrifugiert (Sorvall RC 5B, GS 3, 4200 U min⁻¹, 4 °C). Anschließend kann das Konzentrat entnommen und analysiert werden. Das Volumen des Retentats beträgt unter diesen Bedingungen ca. 5 ml. Zum Erreichen eines größeren Anreicherungsgrades kann die Zentrifugation wiederholt werden, wobei vorher das Filtrat entfernt werden sollte.

5.2.2.2 Acetonfällung

300 μl Proteoliposomen werden mit 1200 μl kaltem Aceton (-80°C) versetzt, geschüttelt und 4 h bei -20°C gelagert. Nach einer anschließenden 5 minütigen Zentrifugation bei 12000 g (Tischzentrifuge, 14500 U min^{-1} , 4°C) wird der Überstand entfernt und das Sediment in 200 μl dest. Wasser gelöst. Die Fällung wird noch einmal wiederholt und das Sediment nach dem Entfernen von Acetonresten im Vakuum direkt im Probenpuffer für die Gelelektrophorese gelöst.

5.2.2.3 Extraktion mit Phenol / Ether

500 μl Proteoliposomen werden mit 500 μl Roti[®]-Collect I versetzt und 20 s intensiv geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 12000 g (Tischzentrifuge, 14500 U min^{-1} , Raumtemperatur) wird die obere Phase entnommen und verworfen. Zu der unteren Phase gibt man 1000 μl Roti[®]-Collect II und rührt 20 s stark durch. Die Probe wird 5 min bei 12000 g zentrifugiert (Tischzentrifuge, 14500 U min^{-1} , Raumtemperatur) und die obere Phase verworfen. Anschließend wird die Extraktion mit Roti[®]-Collect II wiederholt und die obere Phase nach der Zentrifugation verworfen. Die wäßrige untere Phase wird bei reduziertem Druck eingetrocknet und die Proteine im Probenpuffer der Gelelektrophorese aufgenommen.

5.2.3 Solubilisierung von Bacteriorhodopsin

1 ml Purpurmbran (Stamm S9) aus einer Stammlösung mit einer Bacteriorhodopsin-Konzentration von 10 mg/ml werden mit 1 ml Solubilisierungspuffer (Detergens: Triton X-100) versetzt und 20 s im Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung 12 h bei Raumtemperatur im Dunkeln leicht gerührt. Zur Abtrennung nicht solubilisierter Purpurmbran wird 1 h bei 100000 g zentrifugiert (Sorvall RC 28S, F28/36, 28000 U min^{-1} , 4°C), wobei nicht solubilierte Purpurmbran sedimentiert und das solubilierte Bacteriorhodopsin im Überstand verbleibt. Das Sediment wird verworfen und die Konzentration des solubilierten Bacteriorhodopsins im Überstand spektralphotometrisch bestimmt, wobei für dieses ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon_{560 \text{ nm}} = 41000 \text{ mol/l}$ (Dencher, persönliche Mitteilung) zugrunde gelegt wird. Die Ausbeute liegt bei der Solubilisierung in der Regel bei 90 % bis

95 %. Da solubilisiertes Bacteriorhodopsin lichtempfindlich ist, muß es im Dunkeln aufbewahrt werden. Bei Raumtemperatur ist die Lösung nur wenige Tage stabil, bei -20°C kann das Solubilisat etwa zwei Wochen gelagert werden. Die Alterung der solubilisierten Probe kann im Absorptionsspektrum anhand des Auftretens einer Absorptionsbande bei 340 nm verfolgt werden. Abhängig von der Ausbeute erhält man in der Lösung eine Bacteriorhodopsin-Konzentration von 4,5 bis 4,75 mg/ml bei einer Triton X-100-Konzentrationen von 25 mg/ml.

Solubilisierungspuffer, 10 ml, pH 7,0

5 ml 10 % Triton X-100

200 μl 1 M Phosphatpuffer, pH 7,0

4,8 ml dest. Wasser

5.2.4 Herstellung von Lipidvesikeln

Sphärische Lipiddoppelschichten bilden sich spontan aus, wenn man Lipide in Wasser gibt. Diese Vesikel besitzen jedoch in der Regel eine sehr breite Größenverteilung und einen hohen Anteil von multilamellaren Vesikeln. Zur Präparation unilamellarer Vesikel mit einer möglichst definierten Größenverteilung sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden: Bei der „Reverse Phase“-Methode werden die Lipide in Diethylether gelöst und diese Lösung mit einem Puffer gemischt. Durch Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum werden die Lipide aus der organischen in die wäßrige Phase überführt und bilden dabei große unilamellarer Vesikel. Große unilamellare und multilamellare Vesikel können durch die Behandlung mit Ultraschall oder durch das Pressen der Suspension durch eine Membran mit Poren von definierter Größe in kleine unilamellare Vesikel umgewandelt werden.

5.2.4.1 „Reverse Phase“-Methode

Die „Reverse Phase“-Methode wurde von *Szoka et al. (1980)* entwickelt und von *Rigaud (1983)* modifiziert. Da ungesättigte Lipide besonders in Lösung gegen die Oxidation mit

Luftsauerstoff empfindlich sind, werden alle Arbeiten unter einer Stickstoff-Schutzatmosphäre durchgeführt. Zur Präparation von 4 ml Vesikelsuspension mit einer Lipidkonzentration von 16 mg/ml werden die in Chloroform gelösten Lipide in einen Rundkolben gegeben, so daß sich eine Gesamtmenge von 64 mg ergibt. Das Lösungsmittel wird in einem Rotationsverdampfer bei 200 mbar abgezogen, bis die Lipide einen Film auf der Kolbenoberfläche bilden. Anschließend werden Reste des Lösungsmittels 60 min bei 50 mbar abgezogen. In den Rundkolben wird 4 ml Diethylether gegeben und der Lipidfilm darin völlig aufgelöst. Nach der Zugabe von 2 ml Liposomenpuffer wird das Gemisch auf 4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur dreimal je 30 s im Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin) behandelt, wobei sich eine milchige Suspension ausbildet. Im Rotationsverdampfer wird die Suspension bei 600 mbar eingengt, bis sie eine gelartige Konsistenz erreicht. Jetzt werden weitere 2 ml Liposomenpuffer hinzugegeben und anschließend der restliche Diethylether zunächst bei 200 mbar und nach 1 h bei 50 mbar abgezogen. Um unilamellare Vesikel mit einer definierten Größenverteilung zu erhalten, wird die Vesikelsuspension in einem Extruder in zwei Schritten zunächst durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 400 nm und anschließend durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 200 nm gepreßt.

5.2.4.2 Beschall-Methode

In einem Rundkolben werden die Chloroformlösungen der Lipide gemischt und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer bei 600 mbar entfernt. Nachdem sich ein Lipidfilm auf der Glasoberfläche gebildet hat, werden Lösungsmittelreste 60 min bei 50 mbar entfernt. In den Kolben wird so viel Puffer gegeben, daß sich eine Lipidkonzentration von 10 mg/ml ergibt. Der Lipidfilm wird durch intensives Schütteln im Puffer suspendiert und die Suspension in einem Exsikkator 3 min bei 20 mbar entgast. Nach dem Belüften des Exsikkators mit Stickstoff wird der Kolben luftdicht verschlossen und in einem Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin) bei 40°C ca. 10 min beschallt, bis die Trübung der Suspension deutlich geringer geworden ist. Um zu gewährleisten, daß keine großen oder multilamellare Vesikel in der Suspension verbleiben, kann die Suspension anschließend nacheinander durch Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 400 nm und 200 nm gepreßt werden.

5.2.5 Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Liposomen

Zur Rekonstitution von Proteinen in Lipidmembranen stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Allen Methoden ist gemeinsam, daß die Lipidmembran destabilisiert, aufgebrochen oder vollständig aufgelöst wird und so den hydrophilen Bereichen des Proteins der Durchtritt durch die Membran ermöglicht wird. Die „Freeze–Thaw“-Methode und die Rekonstitution durch Detergensentfernung eignen sich sowohl für die Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Liposomen aus Gemischen der Lipide EPC und EPA, als auch für die Rekonstitution in Gemische aus den Lipiden DMPC, DMPA und PS und dem Lipidanalogon DMDAB.

5.2.5.1 Detergensentfernung

1 ml einer Vesikelsuspension mit einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml wird mit 125 μ l des nach der Vorschrift in Abschnitt 5.2.3 solubilisierten Bacteriorhodopsins mit einer Konzentration von 4,5 mg BR/ml und mit 69 μ l 10 % Triton X-100 versetzt und 1 h inkubiert. Insgesamt wird so eine Triton X-100-Konzentration von 10 mg/ml erreicht, welches 1 mg Triton X-100 pro 1 mg Lipid entspricht. Unter leichtem Rühren wird die Suspension mit 100 mg des Adsorbens Bio-Beads versetzt, welches zuvor zweimal mit Methanol und dest. Wasser gewaschen wurde (*Holloway, 1973*). Nach 90 min Inkubation werden weitere 100 mg Bio-Beads zugegeben und nach 90 min Rühren noch einmal 200 mg. Nach 60 min Rühren wird die Vesikelsuspension von den Bio-Beads abgehoben, wobei möglichst wenig von dem Adsorbens in die Suspension gelangen sollte. Dies gelingt am besten, wenn man die Lösung mit einer 1 ml-Pipette absaugt und dabei über die Pipettenspitze noch die Spitze für eine 10 μ l-Pipette stülpt. Deren Öffnung ist zu klein, als daß Bio-Beads-Kügelchen hindurch gelangen könnten. Dann wird die Vesikelsuspension zur Entfernung von Detergensresten noch einmal mit 200 mg Bio-Beads versetzt, über Nacht gerührt und anschließend wieder von den Bio-Beads abgehoben. Zum Erreichen eines definierten Vesikeldurchmessers kann die Suspension in einem Extruder nacheinander durch Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 400 nm und 200 nm gepreßt werden. Alternativ kann die Lösung auch in ein dünnwandiges Reagenzglas (Schott, Fiolax) gefüllt werden und im Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin) dreimal etwa 2 min bei 30 °C (oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids) behandelt werden. Durch den Ultraschall werden Proteoliposomen mit einem sehr kleinen Durchmesser erhalten. Aus diesem geringeren Vesikeldurchmesser resultiert eine geringere Turbidität der

Suspension, was für optische Messungen von Vorteil ist.

5.2.5.2 „Freeze–Thaw“-Methode

Zu 2 ml einer Vesikelsuspension mit einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml gibt man in einem dünnwandigen Reagenzglas (Schott, Fiolax) die gewünschte Menge an Purpurmembran. Die Lösung wird durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff unter heftigem Schütteln eingefroren. (Ohne das Schütteln beim Einfrieren kann die Lösung als solider Block gefrieren und durch die Volumenexpansion des Wassers das Reagenzglas zerstören.) Nachdem die Suspension völlig erstarrt ist, wird sie durch Schwenken in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 40 °C langsam wieder aufgetaut. Nach einer Wiederholung dieser Einfrier–Auftau–Prozedur sollte die Turbidität zugenommen haben. Die Suspension wird jetzt durch Beschallung im Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin) so lange behandelt, bis die Lösung wieder deutlich klarer geworden ist. Um einen quantitativen Einbau und eine homogene Verteilung des Bacteriorhodopsins zu gewährleisten, wird die ganze Prozedur dreimal wiederholt.

5.2.6 Rekonstitution von ATP–Synthase in Liposomen

Die Rekonstitution erfolgt nach einer Vorschrift von *Richard (1991)*. Zu 1 ml Rekonstitutionspuffer gibt man die gewünschte Menge ATP–Synthaselösung und fügt 80 μ l einer 10%igen Triton X–100 Lösung (w/v) hinzu. Diese Lösung gibt man langsam unter Rühren in 1 ml Liposomenlösung (Lipide: EPA, EPC) mit einer Lipidkonzentration von 8 mg/ml und inkubiert 60 min. Anschließend wird die Suspension nacheinander mit zweimal je 80 mg gewaschenen Bio–Beads und einmal mit 160 mg Bio–Beads versetzt, wobei die Lösung nach den Zugaben jeweils 90 min leicht gerührt wird. Die Proteoliposomen können jetzt mit einer Pipette abgesaugt werden. Durch die Verwendung einer sehr dünnen Pipettenspitze kann verhindert werden, daß beim Absaugen Bio–Beads in die Pipette eingesogen werden.

Rekonstitutionspuffer, pH 8,0

20 mM Succinat

20 mM Tricin

80 mM NaCl

0,6 mM KCl

2,5 mM MgCL₂

5.2.7 Korekonstitution von Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in Liposomen

Die Rekonstitution von ATP-Synthase in vorgeformte Lipidvesikel gelingt durch die Zugabe und anschließende Entfernung des Detergens Triton X-100 (*Richard, 1991*). Die Korekonstitution von Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase kann ebenfalls nach dieser Methode durchgeführt werden. Dabei wird dem Ansatz zusätzlich solubilisiertes Bacteriorhodopsin hinzugefügt. Die Menge an zugefügtem Triton X-100 muß um den Betrag verringert werden, der durch die Zugabe des solubilisierten Bacteriorhodopsins eingetragen wird.

Bei allen hier aufgeführten Rekonstitutionsmethoden wird ein Massenverhältnis von Triton X-100 zu Lipid von 1:1 angestrebt. Bei diesem Verhältnis ist die Lipidmembran ausreichend destabilisiert um den Einbau von Proteinen in die Doppelschicht zu ermöglichen. Eigene Titrations von Liposomensuspensionen mit Triton X-100 haben gezeigt, daß die Struktur der Vesikel bei diesen Triton X-100-Konzentrationen nicht vollständig aufgelöst wird. Höhere Detergenkonzentrationen bewirken hingegen eine vollständige Solubilisierung der Lipide. Bei einer anschließenden Entfernung des Detergens bilden sich zwar wieder Proteoliposomen aus, diese weisen jedoch eine größere Trübung auf als die eingesetzten Vesikel. Da die Lichtstreuung von Vesikeln sehr stark von deren Größe abhängt, haben die Proteoliposomen, die sich nach der Entfernung des Detergens bilden wahrscheinlich einen größeren Durchmesser besitzen und bilden eventuell Aggregat aus. Für die Qualität optischer Messungen an Vesikelsystemen ist aber gerade die Transparenz ein entscheidender Faktor. Bei der Korekonstitution von Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in Lipidvesikel ist daher die Überschreitung einer Masse von 1 mg Triton X-100 pro Milligramm Lipid im Rekonstitutionsansatz zu vermeiden. Die nach Abschnitt 5.2.1 präparierten ATP-Synthase-Lösung enthält 4 mg Triton X-100 pro ml, das nach Abschnitt 5.2.3 dargestellte solubilierte Bacteriorhodopsin 25 mg pro ml. Bei einer eventuell zuvor durchgeführten Aufkonzentrierung der ATP-Synthase-Lösung ist zu beachten, daß mit dem Protein auch das Triton X-100 angereichert wird. Die aus dem solubilisierten

Bacteriorhodopsin und der ATP-Synthase-Lösung resultierende Masse an Triton X-100 ($m_{\text{Triton X-100}}$) im Ansatz ergibt sich folglich zu:

$$m_{\text{Triton X-100}} = n_{\text{ATP-Synthase}} \cdot 10 + n_{\text{BR}} \cdot 25 \text{ [mg]}, \quad (23)$$

wobei $n_{\text{ATP-Synthase}}$ das Volumen der ATP-Synthase-Lösung und n_{BR} das Volumen des solubilisierten Bacteriorhodopsins in Milliliter angeben. Überschreitet die hieraus berechnete Masse des Triton X-100 die der Lipide, muß die Korekonstitution nach der in Abschnitt 5.2.7.2 beschriebenen Zweischnitt-Methode durchgeführt werden. Andernfalls kann die in Abschnitt 5.2.7.1 beschriebene Einschnitt-Methode benutzt werden.

5.2.7.1 Einschnitt-Methode

Geringe Mengen von BR und ATP-Synthase (s. o.) können mit einer leichten Modifikation nach der in Abschnitt 5.2.6 dargestellten Vorgehensweise korekonstituiert werden. Zum Rekonstitutionspuffer gibt man zusätzlich zur ATP-Synthase solubilisiertes BR. Da die Lösung des solubilisierten BRs 2,5 % Triton X-100 enthält, muß die Menge des zum Rekonstitutionspuffer zugefügten Triton X-100 entsprechend reduziert werden.

5.2.7.2 Zweischnitt-Methode

Zur Korekonstitution größerer Mengen BR und ATP-Synthase (s. o.) in Liposomen wird zunächst nur das Bacteriorhodopsin nach der Detergensentfernung-Methode oder nach der „Freeze-Thaw“-Methode (Abschnitt 5.2.5.1) in die Liposomen eingebaut. Diese Proteoliposomen werden dann nach der Vorschrift zur Rekonstitution der ATP-Synthase (Abschnitt 5.2.6) eingesetzt.

5.2.8 Teilweise Delipidierung der Purpurmembran ¹

5.2.8.1 Delipidierung der Purpurmembran mit CHAPS

Der Anteil von Lipiden in der Purpurmembran kann durch eine milde Behandlung mit dem Detergens Cholidopropyldiethyl-ammoniopropan-sulfonat (CHAPS) reduziert werden. Dabei werden die Lipide der Purpurmembran durch das Detergens teilweise solubilisiert

¹Die Delipidierungen wurden von Frau Ch. Schröpfer nach einer Vorschrift von N.A. Dencher durchgeführt.

und aus der Membran herausgelöst, während das Kristallgitter der Purpurmembra n erhalten bleibt. Die Delipidierung mit CHAPS ist in *Fitter et al. (1997a)* und *Fitter et al. (1997b)* beschrieben, die Delipidierung mit CHAPS und n-Docecylmaltosid wurde nach einer Vorschrift von *Dencher (persönliche Mitteilung)* durchgeführt.

56 mg Bacteriorhodopsin (Purpurmembra n) werden in 25 ml Acetatpuffer gelöst, mit 307 mg CHAPS (20 mM) versetzt und 20 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. In einer anschließenden 30 minütigen Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) wird die Purpurmembra n sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 25 ml Acetatpuffer aufgenommen, mit 199 mg CHAPS (13 mM) versetzt und 20 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Nach erneuter 20 minütiger Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) wird der Überstand wiederum verworfen und das Sediment noch einmal der gleichen Prozedur mit 169 mg CHAPS (11 mM) unterworfen. Die erhaltene delipidierte Purpurmembra n wird je dreimal in 20 ml dest. Wasser suspendiert, 1 h gerührt und 20 min bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wird jedesmal verworfen.

Acetatpuffer, pH 5,4

6 mM Natriumacetat

0,02 % (w/v) NaN₃

5.2.8.2 Delipidierung der Purpurmembra n mit CHAPS und DDM

67 mg Bacteriorhodopsin (Purpurmembra n) werden in 67 ml Solubilisierungspuffer I (Detergens: CHAPS) gelöst und 20 h im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 min Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) wird der klare Überstand verworfen, das Sediment in 60 ml Solubilisierungspuffer I gelöst und erneut 15 Minuten bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wird das Sediment in 60 ml dest. Wasser gelöst, mit 2,4 g Bio-Beads (40 mg / mg BR) versetzt und zwei Stunden langsam gerührt. Anschließend wird die Lösung durch eine Filtration über Gaze von den Bio-Beads getrennt. Nach 15 min Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) wird der Überstand erneut verworfen und das Sediment in 60 ml

Solubilisierungspuffer II (Detergens: DDM) gelöst, 48 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt und anschließend 15 min bei 100000 g zentrifugiert (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C). Der violett gefärbte Überstand wird abgehoben und das Sediment in 60 ml Waschlösung gelöst und 1,5 h gerührt. Nach einer weiteren 15 minütigen Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) wird der Überstand verworfen und das Sediment in 50 ml dest. Wasser gelöst, mit 2,2 g Bio-Beads versetzt und 1,5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung über Gaze abfiltriert und durch dreimaliges Zentrifugieren bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) und anschließendes Lösen in dest. Wasser gereinigt.

Solubilisierungspuffer I, pH 5,0

5 % (w/v) CHAPS

10 mM MES

Solubilisierungspuffer II, pH 5,0

5 % (w/v) DDM

2 M NaCl

10 mM MES

5.2.9 Abspaltung des Carboxyterminus von Bacteriorhodopsin

Das aus der Purpurmembran herausragende carboxyterminale Ende der Peptidkette des Bacteriorhodopsins kann mit Hilfe der Protease Papain nach einer Vorschrift von *Fimmel (1989)* zwischen den Aminosäuren Gly 231 und Glu 223 abgespalten werden. Abweichend von der Literatur wird bei der Reaktion ein Verhältnis von Bacteriorhodopsin zu Papain von 1:100 eingesetzt (*Fimmel, 1989; Papain : BR = 1 : 200*). Die Notwendigkeit einer höheren Papainkonzentration ist möglicherweise auf eine verringerte Aktivität des Papains aufgrund des Alters dieses Reagens zurückzuführen.

Zur Aktivierung löst man 50 µg Papain (1,9 nmol) in 300 µl Aktivierungspuffer und inkubiert 90 min bei Raumtemperatur. Purpurmembran-Suspension entsprechend einer Masse von 5 mg Bacteriorhodopsin (187 nmol) wird in 1 ml dest. Wasser suspendiert, auf 37 °C erwärmt und die aktivierte Papainlösung hinzugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C unter leichtem Rühren wird die Lösung auf 15 ml mit dest. Wasser verdünnt und dreimal durch 30 min Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) und anschließendes Lösen des Sediments in 15 ml Wasser gewaschen. Die Abspaltung des carboxyterminalen Restes kann anschließend mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft werden.

Aktivierungslösung, pH 7,0

1 mM EDTA

6 mM β -Mercaptoethanol

5 mM Cystein

5.2.10 Markierung der Purpurmembran mit Fluoresceinderivaten

Die Purpurmembran kann durch den Einsatz verschiedener reaktiver Derivate des Fluoresceins selektiv an einzelnen, genau definierten Aminosäuren markiert werden. Fluoresceinsuccinimidylester (Fsucc) bindet an die Aminogruppe der Aminosäuren. Unter geeigneten Bedingungen kann eine selektive Bindung an die Seitenkette von Lysin 129 des Bacteriorhodopsins erreicht werden, das sich auf der extrazellulären Seite der Purpurmembran befindet. Fluoresceiniodacetamid kann kovalent an den Cysteinrest einer Bacteriorhodopsin-Mutante (D36C) gebunden werden, in der die Aminosäure Asparaginsäure 36 gegen Cystein ausgetauscht ist. Die Markierung befindet sich dann auf der zytoplasmatischen Seite der Membran.

Die Markierung der Purpurmembran wird nach Vorschriften von *Heberle & Dencher (1992)*, sowie nach Vorschriften von *Dencher (persönliche Mitteilung)* durchgeführt.

5.2.10.1 Markierung der Purpurmembran mit Fluoresceinsuccinimidylester

Purpurmembran entsprechend einer Masse von 3,4 mg Bacteriorhodopsin (127 nmol) werden in 3,4 ml Markierungspuffer gelöst (1 mg BR/ml, 37 μ M), der pH-Wert auf 8,6 eingestellt und die Lösung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Aggregate, die sich beim zuvor durchgeführten Waschen der Purpurmembran bilden können werden so aufgelöst. 6,13 mg Fluoresceinsuccinimidylester (12,7 μ mol) werden in 170 μ l Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird tropfenweise unter Rühren zu der Purpurmembranlösung zugegeben. Nach der Zugabe wird der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls auf pH 8,6 nachgestellt. Die Lösung wird 20 h im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit dest. Wasser auf 15 ml verdünnt. Durch 30 min Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4°C) und anschließendes Resuspendieren des Sediments in dest. Wasser wird die Suspension mehrfach gewaschen bis der Überstand farblos ist. Um unspezifisch an die Membran gebundenes Fluorescein zu entfernen, wird das Sediment in

Waschpuffer aufgenommen und 20 h gerührt. Anschließend wird die markierte Membran dreimal durch Zentrifugation und Resuspendieren des Sediments erneut gewaschen.

Markierungspuffer, pH 8,6

12,5 mM Na₂B₄O₇ (= 50 mM Borat)

Waschpuffer, pH 8,6

100 mM NaHCO₃

5.2.10.2 Markierung der Purpurmembran mit Fluoresceiniodacetamid

Die Bacteriorhodopsin-Mutante D36C besitzt eine freie SH-Gruppe an der zytoplasmatischen Seite des Proteins, die mit Hilfe des Fluoresceinderivates Iodacetamidofluorescein kovalent markiert werden kann. Da Thiolgruppen oxidationsempfindlich sind, müssen diese Gruppen während der Reaktion mit dem Farbstoff durch Zusatz von DTT geschützt werden. Da DTT selbst freie Thiolgruppen besitzt, muß das Fluoresceinderivat relativ zum DTT in einem Überschuß eingesetzt werden. Das DTT ist deshalb in der Lösung in einem fünffachen Überschuß zum Bacteriorhodopsin enthalten und das Fluoresceinderivat wird in einem 50 fachen Überschuß zugesetzt. Um Oxidationen an der Bacteriorhodopsin-Mutante zu verhindern, sollten alle Reaktionen soweit als möglich unter Schutzgas (Stickstoff, Argon) durchgeführt werden.

Purpurmembran der D36C-Mutante entsprechend einer Masse von 10 mg D36C-Bacteriorhodopsin² (373 nmol) wird in 20 ml einer 5 mM DTT-Lösung suspendiert und 24 h bei Raumtemperatur unter Schutzgas (Stickstoff) gerührt. Die Lösung wird 30 min bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml frisch angesetzten Markierungspuffer gelöst (37,3 µM D36C-BR). Zu dieser Lösung gibt man langsam 9,6 mg (18,7 µmol) Iodacetamidofluorescein, welches zuvor in 500 µl DMF gelöst wurde. Unter Schutzgas wird die Lösung 20 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Anschließend wird das markierte Bacteriorhodopsin durch 30 min Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall RC 28S, F-28/36 Rotor, 28000 U min⁻¹, 4 °C) und Suspendierung des Sediments in dest. Wasser gereinigt, bis der Überstand nach der Zentrifugation farblos ist. Um unspezifisch an die Membran gebundenes Fluorescein zu entfernen, kann die Lösung wie bei der Markierung mit Fluoresceinsuccinimidylester anschließend im Waschpuffer gelöst und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt werden (vgl. Abschnitt 5.2.10.1). Zur Entfernung des Waschpuffers und des gelösten Fluoresceins werden drei Waschschrte durch Zentrifugation durchgeführt.

²Purpurmembran-Präparationen der Bacteriorhodopsin-Mutante D36C wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Oesterheld (MPI Martinsried) zur Verfügung gestellt, wofür ich mich hier ausdrücklich bedanken möchte.

Markierungspuffer, pH 7,2

50 mM Phosphat
10 mM EDTA
1,5 M KCl
5 mM DTT

Waschpuffer, pH 8,6

100 mM NaHCO₃

5.2.10.3 Nachweis des Markierungsgrades

Das molare Verhältnis von kovalent gebundenem Indikator zu Bacteriorhodopsin kann anhand von Absorptionsspektren der Proben gewonnen werden. Aus der Absorption der Lösung bei 568 nm kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Bacteriorhodopsin in der Purpurmembran von $\varepsilon = 63000 \text{ mol/l}$ über das Lambert–Beer’sche Gesetz (Gleichung 10, Seite 11) die Bacteriorhodopsin–Konzentration in der Lösung bestimmt werden. Die Absorption bei 490 nm von Fluorescein in der Lösung ist pH–Wert abhängig. Bei einem pH–Wert, der um zwei Einheiten oberhalb des pK₂–Wertes von Fluorescein liegt, erreicht der Indikator bei 490 nm eine maximale Absorption. Unter diesen Bedingungen liegen die Fluoresceinderivate in ihrer zweifach deprotonierten Form vor. Es gelten Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{490} = 82000 \text{ mol/l}$ (5–IAF) und $\varepsilon_{490} = 68000 \text{ mol/l}$ (Fsucc). Bei einem pH–Wert von 9,5 kann aus der Absorption bei 490 nm mit dem Extinktionskoeffizienten die Konzentration an Fluorescein in der Lösung bestimmt werden. Dabei ist zu beachten, daß durch die Purpurmembran verursachte Lichtstreuung von der optischen Dichte der Probe subtrahiert werden muß. Das molare Verhältnis von Indikator zu Bacteriorhodopsin, der Markierungsgrad, ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentrationen.

5.2.11 Markierung von rekonstituierter ATP–Synthase

Die Markierung der ATP–Synthase mit reaktiven Fluoresceinderivaten wurde nach Vorschriften von *Middendorf (1996)* mit Fluoresceiniodacetamid und Fluoresceinsuccinimidylester durchgeführt. Die Markierung der ATP–Synthase erfolgt dabei immer nach der Rekonstitution in die Lipidvesikel. 1 ml Vesikelsuspension mit einer Lipidkonzentration von 8 mg/ml wird mit 10 μl 1 M Phosphatpuffer versetzt, und der pH–Wert der Lösung eingestellt. Die Markierung mit Fluoresceiniodacetamid wird bei einem pH von 7,3, die mit Fluoresceinsuccinimidylester bei pH 8,5 durchgeführt. Das Fluoresceinderivat wird in 30 μl DMF (3 % der Lösung) gelöst und der Vesikelsuspension unter leichtem Rühren

zugefügt. Die Menge an Fluoresceiniodacetamid und Fluoresceinsuccinimidylester richtet sich dabei nach der Konzentrationen der ATP-Synthase in der Suspension. Bei einem typischen Markierungsversuch einer Suspension mit 50 ATP-Synthase pro Vesikel und einem Überschuß des Fluoresceinderivates von 300 pro ATP-Synthase ergeben sich 0,32 mg Fluoresceiniodacetamid bzw. 0,27 mg Fluoresceinsuccinimidylester. Nach einer Inkubation von 15 min bis 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln werden die Vesikel durch eine Gelpermeationschromatographie unter Verwendung einer vorgepackten PD-10-Säule von dem Reaktionsmedium getrennt. Sollen auch hochmolekulare Stoffe entfernt werden, wie z. B. Proteinbestandteile, die nicht rekonstituiert wurden, wird eine Sephacryl-1000-Säule für die Gelpermeationschromatographie verwendet, die für Proteine eine Ausschlußgrenze > 1000 kDa besitzt. Um letzte Reste des Markierungspuffers zu entfernen, wird die Suspension dreimal je acht Stunden gegen das Medium dialysiert, in welchem die Messungen stattfinden sollen.

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 Protein-Konzentrationsbestimmungen

Die Proteinkonzentration der ATP-Synthase-Präparationen kann nach einer von *Lowry et al. (1951)* entwickelten Methode bestimmt werden. Durch die reduzierende Wirkung einiger Aminosäuren wie z.B. Tyrosin und Tryptophan kann das Folin-Ciocalteus-Reagenz, das einen Molybdän-Wolfram-Komplex enthält, zu Molybdänblau überführt werden. Die Intensität der Blaufärbung wird durch eine Vorbehandlung der Lösung mit einer alkalischen Cu(II)-Lösung erheblich verstärkt, so daß mit dieser Methode Proteinmengen im μg -Bereich bestimmt werden können (*Hartree, 1972*). Gemessen wird die Absorption des entstandenen Molybdänblaus, das ein Absorptionsmaximum bei 650 nm aufweist. Kalibriert wird die Bestimmung durch die Absorption bei Einsatz bekannter Proteinmengen an Rinderserum-Albumin (BSA) und lineare Regression der erhaltenen Wertepaare von Absorption und eingesetzter Proteinmenge. Eine lineare Abhängigkeit der Absorption von der eingesetzten Proteinmenge erhält man bei den hier angegebenen Volumina bis zu einer Proteinmasse von 25 μg .

Zur Durchführung der Bestimmung wird die Proteinprobe, die nicht mehr als 25 μg Protein enthalten soll, mit dest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 μl verdünnt. Ebenso werden aus einem BSA-Standard Lösungen mit Proteinkonzentrationen von 5 μg – 25 μg (BSA) pro 250 μl hergestellt. Die Lösungen werden mit 225 μl Lösung A versetzt und 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem anschließenden Abkühlen auf 20 – 25 °C werden die Proben mit 25 μl Lösung B versetzt und mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann gibt man 750 μl Lösung C zu und durchmischt die Probe sofort. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 50 °C im Wasserbad und Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Absorption der Proben bei 650 nm in Halbmikro-Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer (Hitachi U-1100) gemessen.

Reagenzien

Die Lösungen A und B sind bei Raumtemperatur im Dunkeln etwa 6 Monate haltbar. Die Lösung C muß direkt vor dem Gebrauch frisch angesetzt werden.

Lösung A

2 g Kalium–Natrium–Tartrat
100 g NaHCO₃
500 ml 1 M NaOH
mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen

Lösung B

2 g Kalium–Natrium–Tartrat
1 g CuSO₄ · 5H₂O
10 ml 1 M NaOH
mit dest. Wasser auf 100 ml
auffüllen

Lösung C

4 ml Folin–Ciocalteus–Reagens
(FCR)
60 ml dest. Wasser

5.3.2 Gelelektrophorese und Proteinfärbung**5.3.2.1 Diskontinuierliche SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese**

Zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen können diese in einer SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (PAGE) unter reduzierenden Bedingungen (*Laemmli, 1970*) nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden. Durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) erhalten die Proteine proportional zu ihrer Molekularmasse eine netto negative Ladung. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine zu einer Wanderung durch ein quervernetztes Polyacrylamidgel gezwungen. Die Wanderungsgeschwindigkeit und damit auch die im Trenngel zurückgelegte Distanz ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse der aufgetragenen Proteine.

Die SDS–PAGE wird in einer vertikalen Apparatur (Hofer) mit einer Gelgröße von 100 · 70 · 0,75 mm durchgeführt. In die Gelkammer der Gieß–Apparatur wird die entgaste Trenngellösung bis 20 mm unter dem Rand der Kammer eingefüllt und mit etwas Isopropanol überschichtet, um einen Luftausschluß zu gewährleisten. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wird die Flüssigkeit über dem Gel sorgfältig entfernt. Auf das Trenngel wird die Sammelgellösung bis zum Rand der Kammer gefüllt und sofort eine Taschenschablone eingeführt. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert ist, wird das Gel in die Elektrophorese–Apparatur eingesetzt, die Taschenschablone vorsichtig entfernt und der Elektrodenpuffer eingefüllt.

Vor dem Auftragen der Proben werden diese zunächst mit mindestens 50 % Probenpuffer versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur gelelektrophoretischen Analyse

von Purpurmembranen ist eine Inkubationsdauer von 60 min bei 50 °C nötig, um das Bacteriorhodopsin aus der Membran herauszulösen und zu solubilisieren. Die Menge des Proteins, das in die Taschen des Gels eingefüllt wird, richtet sich nach der Fragestellung und der Empfindlichkeit der verwendeten Färbemethode. Maximal können jedoch bis zu 25 µl pro Geltasche aufgetragen werden. Zur Auftrennung der Proteine wird an das Gel eine Spannung von 100 V – 150 V angelegt. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der im Auftragspuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hat. Anschließend kann das Gel entnommen und angefärbt werden oder eine evtl. vorhandene Fluoreszenzemission von Fluorescein-markierten Proteinen aufgenommen werden.

Verwendete Pufferlösungen und Gelzusammensetzung

Trenngelpuffer, pH 8,8

1,5 M Tris/HCl

Sammelgelpuffer, pH 6,8

1 M Tris/HCl

Elektrodenpuffer, pH 8,6

0,05 M Tris/HCl

0,16 M Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Probenpuffer

15 % (w/v) Saccharose

2,5 % (w/v) SDS

0,25 % (w/v) Na₂CO₃

0,25 M DTT

0,04 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Analyse von Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase eignet sich eine Kombination aus einem Trenngel mit einer Gesamtkonzentration an Acrylamidmonomer von T = 14 % und einem Quervernetzeranteil von C = 4 % und einem Sammelgel mit T = 5 % und C = 3,3 %.

Polymerisationsansatz für ein Trenngel

(T = 14 %, C = 4 %)

8,96 ml rotiphorese[®] Gel A

5,60 ml rotiphorese[®] Gel B

5,00 ml Trenngelpuffer

192 µl dest. Wasser

90 µl 20 % SDS

14,3 µl TEMED

143 µl 10 % APS

Polymerisationsansatz für ein Sammelgel

(T = 5 %, C = 3,3 %)

1,65 ml Acryl-/Bisacrylamid 29:1

1,25 ml Sammelgelpuffer

6,9 ml dest. Wasser

46,6 µl 20 % SDS

12,7 µl TEMED

84,7 µl 10 % APS

5.3.2.2 Coomassie–Blau–Färbung

Gele mit einem Proteingehalt von $0,1 \mu\text{g} - 2 \mu\text{g}$ pro Bande können mit dem Farbstoff Coomassie–Brilliant Blau R–250 angefärbt werden (Weber & Osborn, 1969). Eine von Görg *et al.* (1978) modifizierte Variante dieser Methode ist durch den Zusatz von Kupfer(II)–Ionen drei- bis fünfmal sensitiver.

Das Gel wird in einer Glasschale mit 150 ml Coomassie–Färbelösung überschichtet und 30 min auf einem Schüttler geschwenkt. Die Färbelösung wird entfernt und das Gel wiederholt in 150 ml der Entfärbelösung geschüttelt. Benutzte Entfärbelösung kann durch Filtration über Aktivkohle regeneriert werden. Die Färbung ist abgeschlossen, wenn die unspezifische Hintergrundfärbung beseitigt ist und das Gel einen maximalen Kontrast aufweist.

Färbelösung I (nach Görg et al., 1978)

5 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
400 ml dest. Wasser
100 ml Eisessig

Färbelösung II (nach Görg et al., 1978)

1,5 g Coomassie–Brilliant Blau R–250
450 ml Methanol
50 ml dest. Wasser

Färbelösung I und Färbelösung II 1:1 mischen

Entfärbelösung (nach Görg et al., 1978)

10 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1300 ml dest. Wasser
200 ml Eisessig
500 ml Methanol

5.3.2.3 Silberfärbung nach Oakley

Mit der Silberfärbung nach Oakley *et al.* (1980) lassen sich noch Banden mit einem Proteingehalt von 5 ng nachweisen. Die Methode beruht auf der Komplexierung von Silberionen durch das Protein in einem alkalischen Medium. Entwickelt wird das Gel im Sauren unter Zusatz von Formaldehyd.

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten muß das Gel jeweils durch dreimaliges, 30 minütiges Schwenken in dest. Wasser gespült werden. Zunächst wird das Gel dreimal 60 min oder

einmal über Nacht mit Fixierlösung I behandelt. Nach dem Spülen des Gels mit dest. Wasser wird es 15 min in Fixierlösung II geschüttelt. Als nächstes erfolgt nach Spülen mit Wasser, eine 20 minütige Behandlung mit der Silber-Färbelösung. Entwickelt wird das Gel durch Schwenken in der Entwicklerlösung, bis die Proteinbanden sichtbar werden und sich ein optimaler Kontrast eingestellt hat. Nach der Entwicklung muß das Gel sehr gründlich gespült werden, da im Gel verbleibende Silberreste den Hintergrund langsam dunkel färben.

Fixierlösung I

150 ml Methanol
37,5 ml Eisessig
112,5 ml dest. Wasser

Fixierlösung II

4,75 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
240 ml Wasser
10 ml 25 % (v/v) Glutaraldehyd

Silber-Färbelösung (200 ml)

38,0 ml dest. Wasser
3,7 ml 1 M NaOH
2,5 ml konz. Ammoniaklösung
8,0 ml 20 % (w/v) AgNO_3

Entwickler (200 ml)

20,0 ml Ethanol
1,2 ml 1 % (w/v) Citronensäure
50 μl 35 % (w/v) Formaldehyd

5.3.3 Aktivitätsbestimmung der ATP-Synthase

Die Aktivität der ATP-Synthase kann in rekonstituierten Vesikeln gemessen werden, indem man gleichzeitig eine elektrische Potentialdifferenz und eine Protonenkonzentrationsdifferenz über die Vesikelmembran erzeugt und die ATP-Syntheserate der ATP-Synthase mißt. Als Detektionssystem eignet sich hierbei ein Luciferin-Luciferase-Testsystem, das in Anwesenheit von ATP eine Biolumineszenz erzeugt. Die Biolumineszenz ist proportional zur ATP-Konzentration und kann in einem Luminometer gemessen werden. Der Puffer, in dem die Messungen durchgeführt werden, muß eine Umgebung zur Verfügung stellen, in der die ATP-Synthase aktiv sein kann. Insbesondere müssen die Edukte ADP und Phosphat vorliegen, sowie die zur katalytischen Aktivität notwendigen Magnesiumionen. Die Protonenkonzentrationsdifferenz erzeugt man durch Inkubation der Vesikel in einem Puffer mit einem pH-Wert von 4,7, der sich mit dem Lumen der Vesikel äquilibriert. Anschließend schnelle Zugabe eines basischen Puffers bewirkt, daß sich außerhalb der Vesikel ein pH-Wert von 8,0 einstellt. Die elektrische Potentialdifferenz kommt durch

unterschiedliche Kaliumionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb des Vesikels zustande. In den Vesikeln beträgt die Kaliumkonzentration 0,6 mM, während sie außen ca. 100 mM beträgt. Durch den Zusatz des Kalium-spezifischen Ionophors Valinomycin können die Kaliumionen in das Vesikel strömen und bauen dabei eine elektrische Potentialdifferenz auf. Aus der Konzentrationsdifferenz der Kaliumionen resultiert unter Standardbedingungen eine Potentialdifferenz von 130 mV.

Zur Durchführung werden 50 μl Proteoliposomen einer Lipidkonzentration von 8 mg/ml mit 150 μl Rekonstitutionspuffer gemischt. Davon werden 43 μl zusammen mit 217 μl Puffer L1 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und unter Rühren exakt 2 min inkubiert. Währenddessen füllt man 240 μl Puffer L2 und 12,5 μl Luciferin-Luciferase-Lösung in eine Clinicon-Küvette und mißt im Luminometer die Untergrundlumineszenz, die mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet wird. Nach etwa 100 s werden die inkubierten Proteoliposomen in einer Spritze mit langer Kanüle aufgezogen und nach genau 2 min durch ein Septum in die Küvette im Luminometer injiziert. Die durch den ΔpH - $\Delta\phi$ -Sprung ausgelöste ATP-Synthese führt zu einer Zunahme der Lumineszenz, die wiederum mit einem Schreiber aufgezeichnet wird. Sobald die Lumineszenz ihren Sättigungswert erreicht hat, wird das Signal durch Zugabe von 20 μl einer 10^{-5} M ATP-Standardlösung kalibriert. Da beim Injizieren der Vesikel 20 μl in der Kanüle verbleiben, werden statt der 260 μl effektiv nur 240 μl injiziert, was 200 μl Puffer L1 und 40 μl verdünnter Proteoliposomen entspricht.

Zur Auswertung wird die Schreiberauslenkung zunächst mit Hilfe der Kalibrierung in eine ATP-Konzentration umgerechnet. Aus der Anfangssteigung der Kurve nach Injektion der Proteoliposomen ergibt sich mit Hilfe der Enzymgesamtkonzentration die maximale Syntheserate pro ATP-Synthase. Dies gilt jedoch nur, wenn die ATP-Synthese langsam ist im Vergleich zur Durchmischung der beiden Lösungen und zum Aufbau der elektrischen Potentialdifferenz. Bei Proteoliposomen, die viele ATP-Synthasen enthalten, scheint der ΔpH - $\Delta\phi$ -Sprung der limitierende Faktor zu sein, wodurch die apparente maximale Syntheserate mit zunehmender Anzahl an ATP-Synthasen pro Vesikel geringer wird.

*Puffer L1, pH 4,7*5 mM NaH₂PO₄

2,5 mM MgCl

0,6 mM KCl

1 μ M Valinomycin*Puffer L2, pH 8,7*

200 mM Tricin

5 mM NaH₂PO₄

2,5 mM MgCl

120 mM KCl

200 μ M ADP**5.3.4 Phosphatbestimmung**

Die Effektivität der Delipidierung kann durch eine Bestimmung des Phosphatgehalts der Purpurmembraan überprüft werden. In einer von *Ames und Dubin (1960)* entwickelten Methode wird das Phosphat aus den Kopfgruppen der Lipide durch pyrolytische Oxidation mit Nitrat aus dem biologischen Material freigesetzt und als Molybdänblau nachgewiesen. Zur Bestimmung des Delipidierungsgrades wird der Phosphatgehalt der delipidierten Purpurmembraan mit dem der nativen Membran verglichen.

150 μ g Purpurmembraan wird mit 120 μ l einer Magnesiumnitratlösung (10 %ig in Ethanol) versetzt. Die Probe wird über einem Bunsenbrenner vorsichtig bis zur Trockene eingedampft und anschließend erhitzt, bis eine Veraschung der Probe eingetreten ist und keine nitrosen Gase mehr entweichen. Der Rückstand wird in 300 μ l einer 0,5 M Salzsäure durch Behandlung mit Ultraschall (Sonorex TK 52 H, Bandelin) gelöst und 15 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur werden 700 μ l Molybdatlösung hinzugefügt und 20 min bei 45 °C inkubiert. Die Absorption des gebildeten Molybdänblaus wird im Spektralphotometer bei 820 nm gemessen.

Molybdatlösung

1 Teil 10 % (w/v) Ascorbinsäure

6 Teile 0,42 % (w/v) Ammoniummolybdat in 0,5 M Schwefelsäure

5.3.5 Messung der Protonentranslokation

Die Protonentranslokation wird durch Absorptionsänderungen von pH-Indikatoren detektiert, die in das System eingefügt werden. Da Bacteriorhodopsin nach der Lichtanregung ebenfalls Absorptionsänderungen im gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums

aufweist, ergibt sich bei Einsatz der Indikatoren immer eine Überlagerung zwischen Indikatorsignal und Photozyklussignal. Zur Isolierung des Indikatorsignals muß eine Differenzbildung zweier Messungen durchgeführt werden, bei der das Photozyklussignal von dem überlagerten Signal abgezogen wird. Um das Photozyklussignal zu erhalten, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: Die Messung der transienten Absorptionsänderung ohne im System enthaltenen Indikator oder die Unterdrückung des Indikatorsignals durch Zugabe von Puffer. Bei der Messung der Protonentranslokation mit Pyranin in der wäßrigen Phase sind beide Möglichkeiten durchführbar. Bei Einsatz von kovalent an die Purpurmembran gebundenen Indikatoren ist nur die Unterdrückung des Indikatorsignals durch Zugabe von Puffer möglich. Da die beiden Messungen (Photozyklussignal und mit Indikator überlagertes Signal) unter möglichst gleichen Bedingungen stattfinden sollten, ist bei den Messungen mit Pyranin die Zugabe des Indikators nach der Referenzmessung der Zugabe von Puffer nach dem überlagerten Signal vorzuziehen. Die Zugabe von Pyranin in μM -Konzentrationen ist eine kleinere Änderung des Systems als die Zugabe von Puffer in mM -Konzentrationen.

Die Messungen werden in einer Halbmikro-Quarzküvette (Innendimension: $4\text{ mm} \cdot 10\text{ mm}$) durchgeführt, die am unteren Ende eine Verbreiterung aufweist und damit den Einsatz eines Magnetührstabes zum Rühren der Lösung erlaubt. Die Küvette wird so in das Blitzlicht-Absorptionsspektrometer eingesetzt, daß die größere der beiden Innendimensionen in Richtung des Abtaststrahlenganges weist. Zum einen ist in dieser Anordnung die Intensitätsänderung des Abtastlichtes maximal. Zum anderen wird die Probe gleichmäßiger belichtet, wenn das Anregungslicht nur eine kurze Wegstrecke in der Lösung zurücklegen muß. Die Verwendung von Küvetten mit unpolierten Seitenfenstern hat sich als günstig erwiesen, da die Streuung des Anregungslichtes zu einer gleichmäßigeren Belichtung der Probe führt. Aufgrund der Geometrien von Anregungs- und Abtaststrahlengang ist eine Füllhöhe der Probe von 8 mm in der Küvette erforderlich. Bei Verwendung einer Halbmikro-Quarzküvette ergibt sich daraus eine minimale Füllmenge von $800\text{ }\mu\text{l}$ für einfache Küvetten und von $1100\text{ }\mu\text{l}$ für rührfähige Küvette bei Einsatz eines Magnetührstabes ($1200\text{ }\mu\text{l}$ ohne Magnetührstab).

5.3.5.1 Messung der Protonentranslokation ins wäßrige Medium

$0,8 - 1,5\text{ ml}$ einer Probe mit einer Bacteriorhodopsin-Konzentration von $0,1 - 0,4\text{ mg/ml}$ (entsprechend einer Absorption von $A_{568} = 0,2 - 0,8$) werden in eine Halbmikro-Quarz-

küvette gefüllt und in einem Exsikkator 3 min bei einem Druck von 20 mbar sorgfältig entgast. Die Küvette wird dann in den Küvettenhalter des Spektrometers eingeführt und mit Hilfe des Thermostaten auf die gewünschte Temperatur gebracht. Durch das Einfügen einer pH-Elektrode in die Lösung kann der pH-Wert kontrolliert werden und mit Hilfe einer Mikroliterspritze durch Zugabe verdünnter Natronlauge oder Salzsäure eingestellt werden. Dabei hat es sich als günstig erwiesen, diese beiden Reagenzien in Konzentration von 10 mM, 100 mM und 1 M einzusetzen. Die kontinuierliche Aufzeichnung des pH-Wertes und die Anzeige seines zeitlichen Verlaufes auf einem Monitor erleichtert die Einstellung des gewünschten pH-Wertes.

Die transienten Absorptionsänderungen werden mit einer Anregungsenergie von 2 – 20 mJ bei einer Wellenlänge von 532 nm aufgenommen. Aufgezeichnet werden die transienten Absorptionsänderungen bei den Abtastwellenlängen 412 nm, 457 nm und 568 nm. Bei 457 nm zeigt Pyranin maximale Absorptionsänderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Absorptionsänderungen bei 412 nm und 568 nm dienen bei der Differenzbildung der Signale (vgl. Abschnitt 5.3.5.3 zur Kalibrierung und geben Hinweise auf die Qualität der Messungen. Die bei den einzelnen Wellenlängen zu mitteln den Messungen hängen von den Eigenschaften der Probe und dem erwarteten Signal-Rausch-Verhältnis ab. In der Regel werden bei den Wellenlängen 412 nm und 568 nm 16 Messungen gemittelt und bei 457 nm 25 – 49 Messungen. Danach werden der Lösung 1,5 bis 5,0 μ l einer 10 mM Pyraninlösung zugefügt, so daß die Indikatorkonzentration in der Lösung 15 – 50 μ M beträgt. Nach oben beschriebener Methode wird der pH-Wert wieder exakt auf den Wert vor der Zugabe des Indikators eingestellt. Die transienten Absorptionsänderungen können jetzt unter ansonsten gleichen äußeren Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Anzahl der gemittelten Messungen) wie vor der Indikatorzugabe aufgenommen werden.

5.3.5.2 Messung der Protonentranslokation an der Oberfläche der Membran

0,8 – 1,5 ml einer mit dem pH-Indikator Fluorescein markierten Purpormembran-Suspension werden in eine Halbmikro-Quarzküvette gefüllt und in einem Exsikkator 3 min bei einem Druck von 20 mbar sorgfältig entgast. Nach der Temperierung der Probe im Spektrometer und pH-Wert-Einstellung werden die transienten Absorptionsänderungen bei Abtastwellenlängen von 412 nm, 490 nm und 568 nm mit Anregungsenergien von 2 – 20 mJ bei einer Wellenlänge von 532 nm aufgezeichnet. Wie bei der Messung der Protonentranslokation mit Pyranin in der wäßrigen Phase dienen die transienten Absorptionsänderungen

bei 412 nm und 568 nm zur Kalibrierung und Evaluierung der aufgenommenen Signale. Anschließend werden der Lösung 0,8 – 15,0 μl eines 1,0 M Imidazolpuffers oder eines 1,0 M Phosphatpuffers zugegeben, so daß sich in der Probe eine Pufferkonzentration von 10 μM ergibt. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf den Wert vor der Pufferzugabe werden wieder die transienten Absorptionsänderungen bei den drei Abtastwellenlängen unter ansonsten gleichen äußeren Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Anzahl der gemittelten Messungen) aufgenommen.

5.3.5.3 Differenzbildung der transienten Absorptionsänderungen

Durch leichte Schwankungen in der Intensität des Anregungsstrahls und durch Abweichungen anderer Systemparameter wie dem pH-Wert oder der Temperatur kann es zu Abweichungen der Amplituden der transienten Absorptionsänderungen im Photozyklus kommen. Tritt eine solche Abweichung zwischen der Messung des überlagerten Signals (Photozyklus plus Indikatorsignal) und der Referenzmessung (nur Photozyklussignal) auf, dann finden sich diese Abweichungen bei einer einfachen Differenzbildung im Indikatorsignal wieder und verfälschen dieses.

Da die zur Messung verwendeten Indikatoren Fluorescein und Pyranin bei 568 nm keine Absorption aufweisen, beeinflussen diese die transienten Absorptionsänderungen der beiden Messungen (Photozyklussignal und überlagertes Signal) bei dieser Wellenlänge nicht. Die Differenz der beiden Messungen bei dieser Wellenlänge sollte deshalb proportional auch im Photozyklusanteil der Signale bei allen anderen Wellenlängen vorhanden sein. Um diese Differenzen im Photozyklussignal bei der Messung der Protonentranslokation zu kompensieren, werden die Messungen bei den Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Indikatoren (457 nm für Pyranin und 490 nm für Fluorescein) mit Hilfe der Signale bei 568 nm aufeinander normiert. Dazu wird zunächst die Differenz der 568 nm-Signale berechnet $\left(\int_{t=0}^{\infty} [A_{\text{Messung}}(t) - f \cdot A_{\text{Referenz}}(t)] \right)$, wobei das Signal der Referenzmessung vor der Differenzbildung mit einem Skalierungsfaktor f multipliziert wird. Durch Variation dieses Skalierungsfaktors wird der Wert für f bestimmt, bei welchem die Differenz der beiden 568 nm-Signale minimal ist. Zur Isolierung der Indikatorsignale bei 457 nm und bei 490 nm werden dann die transienten Absorptionsänderungen der Referenzmessung ebenfalls vor der Differenzbildung mit diesem Skalierungsfaktor f multipliziert.

5.3.6 Absorptions- und Fluoreszenztitrationen

Mit Hilfe von Titrationen kann der pK-Wert saurer oder basischer Gruppen und die Pufferkapazität der Lösung bestimmt werden. Die Messungen werden im Blitzlicht-Spektrometer durchgeführt. Als Observablen können dabei sowohl die Absorption und die Fluoreszenzintensität als auch der pH-Wert aufgenommen werden. Zur Messung der Fluoreszenzintensität kann die Empfindlichkeit des Detektors durch Verringerung der Photomultiplier-Spannung auf -900 V vergrößert werden. Die Signale werden von einem Analog-Digital-Wandler konvertiert, von einem Computer aufgenommen und gegen die Zeit aufgetragen. Ein zu diesem Zwecke entwickeltes Computerprogramm ist in der Lage, zwei Observablen simultan aufzuzeichnen und gegen eine Zeitachse darzustellen. Die Zugabe von Säure oder Base zu der Lösung wird mit Hilfe einer motorbetriebenen μl -Spritze (Hamilton) durchgeführt. Die μl -Spritze faßt ein Volumen von 50 μl , welches impulsgesteuert schrittweise in Portionen von 0,5 μl bis 50,0 μl durch einen dünnen Teflonschlauch in die Lösung abgegeben wird. Die Impulse erhält die Mikroliterspritze von einem Impulszeitgeber, der es erlaubt, eine Anzahl von 1 bis 1000 Impulsen in Intervallen von sechs bis 6000 s auszugeben.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden in der Regel Volumina von 0,5 μl in Intervallen von 30 s zur Lösung hinzugegeben. Wird der Impulszeitgeber zeitgleich mit der Aufnahme der Observablen gestartet, kann die Zeitachse direkt in das Volumen der zugegebenen Titrationslösung umgerechnet werden.

5.4 Datenauswertung

Die Berechnung der Differenzspektren erfolgt mit Hilfe des von *Thiedemann (1994)* entwickelten Programms „Diff.exe“. Die zur kinetischen Auswertung durchgeführten Anpassungen von Multiexponentialfunktionen an die transienten Absorptionsänderungen wurden mit dem ebenfalls von *Thiedemann (1994)* entwickelten Programm „Curfit.exe“ durchgeführt. Alle anderen mathematischen Anpassungen und die graphischen Darstellungen der Meßwerte erfolgten mit dem Programm „Origin41“.

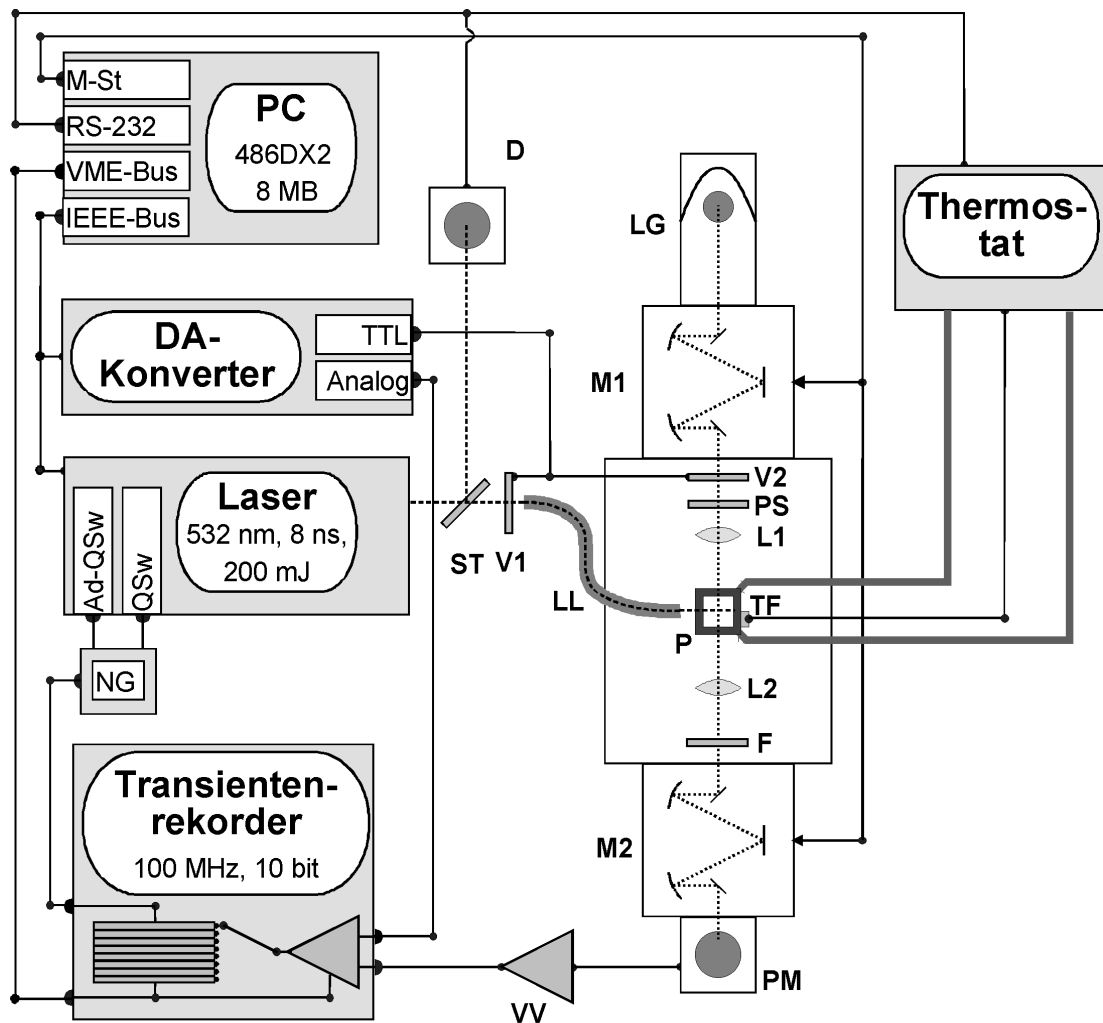
6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Aufbau des Blitzlicht–Absorptionsspektrometers

Das Blitzlicht–Absorptionsspektrometer erlaubt die Aufnahme von transienten Absorptionsänderungen in einer Probe, nachdem diese durch einen Laserblitz angeregt wurde. Die Anregung der Probe kann mit Laserblitzen der Wellenlängen 1064 nm, 532 nm und 355 nm, mit einer Anregungsenergie bis 200 mJ bei einer Pulsdauer von 8 ns erfolgen. Absorptionsänderungen der Probe lassen sich in einem Wellenlängenbereich von 280 nm bis 750 nm verfolgen. Der zeitliche Meßbereich des Spektrometers reicht von 10^{-8} s bis 100 s. Aufgrund der Eigenschaften des Transientenrekorders läßt sich dieser gesamte Zeitbereich simultan in einer Messung aufnehmen. Die optische Auflösung des Spektrometers erreicht bei optimalen Eigenschaften der Probe im Zeitbereich $> 10 \mu\text{s}$ Werte von kleiner als $50 \mu\text{OD}$. Das Spektrometer wurde nach dem Vorbild eines am Hahn–Meitner–Institut Berlin von *Thiedemann (1994)* entwickelten Blitzlicht–Absorptionsspektrometer aufgebaut. Auch das von *Thiedemann (1994)* entwickelte Programm zur Steuerung dieses Spektrometers wurde übernommen, in der Funktionalität erweitert und an die veränderten Komponenten des Spektrometers angepaßt.

Ein Blockdiagramm des Blitzlicht–Spektrometers ist in Abbildung 8 dargestellt. Die im folgenden verwendeten Buchstabenkürzel beziehen sich auf diese Abbildung. Eine detaillierte Liste der Komponenten des Spektrometers findet sich im Anhang in Tabelle 28 auf Seite 187. Das Blitzlicht–Spektrometer ist in einer T–Konfiguration aufgebaut. In der Probe (P) kreuzt sich der Anregungsstrahlengang in einem rechten Winkel mit dem Absorptionsstrahlengang. Ausgelöst durch einen Laserimpuls ändern sich die Absorptionseigenschaften der Probe. Die daraus resultierenden Intensitätsänderungen des Abtaststrahls hinter der Probe werden von einem Photomultiplier (PM) detektiert und in ein Stromsignal umgewandelt. Dieses Stromsignal wird vom Vorverstärker (VV) in ein Spannungssignal konvertiert und vom Transientenrekorder aufgezeichnet. Ein Computer berechnet aus den aufgenommenen Spannungssignalen die transienten Absorptionsänderungen und dient außerdem zur Steuerung und Kontrolle der einzelnen Komponenten des Blitzlicht–Spektrometers.

Als Lichtquelle für den Absorptionsstrahlengang dient eine 75 W Xenon–Kurbogenlampe (L2194–01, Hamamatsu Photonics, Japan), die mit einer rauscharmen Stromversorgung



Ad-QSw	: Advanced Q-Switch-Signal	PS	: Polarisator
D	: Energiedetektor	QSw	: Q-Switch-Signal
F	: Schmalbandfilter	RS-232	: serielle Schnittstelle
IEEE	: parallele Schnittstelle	ST	: Strahlteiler
L1, L2	: Linsen	TF	: Thermofühler
LG	: Lampengehäuse	TTL	: Transistor-Transistor-Logik
LL	: Lichtleiter	V1, V2	: Photoverschlüsse
M1, M2	: Monochromatoren	VME-Bus	: Computer-Schnittstelle
M-St	: Monochromatorsteuerung	VV	: Vorverstärker
NG	: NAND-Gatter	—	: elektrische Leitungen
P	: Probenhalter	: Abtaststrahlengang
PM	: Photomultiplier	----	: Anregungsstrahlengang

Abbildung 8: Blockdiagramm des Blitzlicht-Absorptionsspektrometers.

(LPS-220, PhotoMed, Wedel) betrieben wird. Die Lampe ist in einem Lampengehäuse (LG) montiert (PhotoMed, Wedel), in dem sich auch ein Parabolspiegel befindet, der das Licht auf den Eintrittsspalt des ersten Gittermonochromators (M1) (Modell 101, PhotoMed, Wedel) fokussiert. Hinter dem Austrittsspalt des ersten Monochromators befindet sich ein Photoverschluß (V2), mit dessen Hilfe der Abtaststrahl zur Bestimmung des Dunkelstromes des Photomultipliers (PM) abgeblockt werden kann. Das aus dem ersten Monochromator austretende Licht wird durch eine Quarzlinse (L1) mit einer Brennweite von $f = 50$ mm auf die Probe fokussiert. Eine zweite, identische Linse (L2) hinter der Probe sammelt das Licht und fokussiert es auf den Eintrittsspalt des zweiten Gittermonochromators (M2). Vor dem zweiten Monochromator befindet sich ein holographischer Schmalbandfilter (F) (Notch-Filter) mit einem Absorptionsmaximum von 532 nm bei einer optischen Dichte von $OD = 8$ und einer Halbwertsbreite von 20 nm (HNPF-532-1.0, L.O.T.-Oriel GmbH, Langenberg). Durch den Schmalbandfilter wird gestreutes Laserlicht vom Detektor ferngehalten. Die Wellenlänge des zweiten Monochromators wird so abgestimmt, daß der Abtaststrahl diesen Monochromator mit maximaler Intensität passiert. Fluoreszenzlicht, das durch den Abtaststrahl und durch das Laserlicht in der Probe entsteht, wird so vom Detektor ferngehalten. Die Fluoreszenzintensität, die durch den Laserimpuls ausgelöst wird, kann so groß sein, daß sie die Intensität des Abtaststrahls in einem Zeitbereich bis 10^{-7} s übertrifft. Ohne die Filterung durch den zweiten Monochromator kann es zu Beschädigungen am Photomultiplier kommen.

Das aus dem zweiten Monochromator austretende Licht wird vom Photomultiplier (PM) (R928, Hamamatsu) detektiert. Das Gehäuse und die Beschaltung des Photomultipliers wurden im Hahn-Meitner-Institut Berlin entwickelt und gebaut. Die elektronische Schaltung des Photomultipliers ist in *Thiedemann (1994)* beschrieben. Die Versorgung des Photomultipliers mit Hochspannung erfolgt durch ein rauscharmes, spannungsstabilisiertes Hochspannungsnetzgerät (PS310-1250V-25W, Stanford Research, Gilching). Der Anodenstrom des Photomultipliers fließt über einen möglichst kurzen Leitungsweg über den Eingangswiderstand des Vorverstärkers (VV) (Modell 571, hms electronic). Durch den Eingangswiderstand von wahlweise 50 Ω oder 1 k Ω wird das Stromsignal des Photomultipliers in ein Spannungssignal umgewandelt und anschließend wahlweise um 20 dB oder 40 dB verstärkt. Bei einem Eingangswiderstand von 1 k Ω wird das primäre Stromsignal in ein größeres Spannungssignal übersetzt. Dadurch wird das Spannungssignal rauschärmer als bei einem Eingangswiderstand von 50 Ω . Da der Eingangswiderstand des Vorverstärkers mit der Kapazität des Photomultipliers zusammen ein RC-Glied bil-

det, wird hierdurch die Bandbreite beschränkt. Diese liegt bei einem Eingangswiderstand von $1\text{ k}\Omega$ unterhalb von 50 MHz und ist damit kleiner als die maximale zeitliche Auflösung des Transientenrekorders (siehe Abschnitt 6.3.1).

Das Ausgangssignal des Vorverstärkers wird von einem Transientenrekorder (TR-AS 110, Dr. Strauss, Gundesheim) mit hoher Zeit- und Spannungsauflösung aufgezeichnet. Der Transientenrekorder besteht aus einem Differenzeingangsverstärker, einer Controllerkarte und einem Speichermodul. Alle Funktionen des Transientenrekorders lassen sich über einen VME-Bus steuern, über den auch die aufgenommenen Werte ausgelesen werden. Der Eingangsverstärker besitzt einen invertierenden Eingang und einen internen DA-Wandler, über die konstante Spannungsanteile kompensiert werden können. Die Verstärkung kann in mehreren Stufen so eingestellt werden, daß Signale mit Amplituden von $\pm 5\text{ mV}$ bis $\pm 1\text{ V}$ auf den vollen Auflösungsbereich des Transientenrekorders abgebildet werden. Die Spannungsauflösung des Transientenrekorders beträgt 10 bit (entsprechend 1024 Werte). Insgesamt werden pro Transiente 524288 Werte aufgenommen, die sich auf acht sequentielle Segmente mit je 65536 Werten verteilen. Die Abtastrate kann dabei für jedes Segment einzeln programmiert werden. Die Abtastraten des Transientenrekorders betragen 100 MHz bis $2,5\text{ kHz}$. Insgesamt sind die Abtastraten $10 \cdot 10^n\text{ MHz}$, $5 \cdot 10^n\text{ MHz}$ und $2,5 \cdot 10^n\text{ MHz}$ mit $7 \geq n \geq 3$ möglich. Wählt man für das erste Segment eine Abtastrate von 100 MHz und für jedes weitere Segment sukzessiv kleinere Abtastraten, dann lassen sich in einem Meßzyklus Signale komplexer Prozesse aufnehmen, deren Geschwindigkeitskonstanten sich über bis zu 10 Größenordnungen erstrecken.

Die am invertierenden Eingang des Transientenrekorders angelegte Kompensationsspannung wird von einem Digital-Analog-Konverter (DAC8, Hahn-Meitner-Institut, Berlin) bereitgestellt. Der Digital-Analog-Konverter wird über einen IEEE-Bus gesteuert und besitzt zwei analoge Ausgänge und acht TTL-Ausgänge. Der zweite analoge Ausgang wird benutzt, um einen Rührmotor unter dem Probenhalter anzutreiben. Über einen auf der Motorachse angebrachten Stabmagneten kann so die Lösung in der Küvette durch einen Magnetührstab gerührt werden. Die TTL-Ausgänge des Digital-Analog-Konverters werden benutzt, um mit Hilfe von Steuergeräten (Compur electronic m, Prontor Werk Alfred Gauthier, Wildbad / Schw.) die beiden Photoverschlüsse (V1, V2) zu steuern, die sich im Anregungs- und im Abtaststrahlengang befinden.

Die Probe, die sich in einer Küvette im Probenhalter (P) befindet, kann durch einen Thermostaten (F20-MH, Julabo Labortechnik, Seelbach / Schw.) temperiert werden. Die

Einstellung des Thermostaten kann sowohl manuell als auch über eine serielle Schnittstelle vorgenommen werden. Die Temperaturkontrolle des Thermostaten erfolgt wahlweise über ein internes Badthermometer oder über einen externen PT-100-Thermofühler (TF), der wahlweise am Küvettenhalter befestigt ist oder sich direkt in der Probe befindet.

Angeregt wird die Probe durch einen frequenzverdoppelten, gütegeschalteten Nd:YAG-Laser (GCR130-10, Spektra Physics, Darmstadt), der über eine IEEE-Schnittstelle gesteuert wird. Neben der Grundschwingung des Lasers mit einer Wellenlänge von 1064 nm können auch Laserblitze mit Wellenlängen von 532 nm und 355 nm bei einer Pulsdauer von 8 ns erzeugt werden. Optional ist auch die Erzeugung der vierten Harmonischen mit einer Wellenlänge von 266 nm möglich. Der aus dem Laser ausgekoppelte Strahl wird von einem Strahlteiler (ST) im Verhältnis 50:50 geteilt. Der eine der beiden Strahlen gelangt nach Aufweitung auf einen Energiedetektor (D) (818J-25B, Newport, Darmstadt), der an ein Energiemeter (1825-C, Newport, Darmstadt) angeschlossen ist. Mit Hilfe dieses Meßsystems ist es möglich, die Energie der Anregungsblitze zu bestimmen. Das analoge Ausgangssignal des Energiemeters wird von einem Analog-Digital-Wandler (Lablogg2) abgetastet, der über eine serielle Schnittstelle mit dem Computer verbunden ist. Der zweite Teil des Strahls wird durch einen Photoverschluß (V2) geführt, der es ermöglicht, den Anregungsimpuls auszublenden. Hinter dem Photoverschluß wird der Laserstrahl in einen Lichtleiter (LL) (Hundt, Wetzlar) aus optischem Glas (BK7) eingekoppelt, der das Licht an den Probenort führt. Der Lichtleiter besitzt auf der Eintrittsseite, analog zum Strahlprofil, einen runden Querschnitt mit einem Durchmesser von 8 mm und auf der Austrittsseite einen rechteckigen Querschnitt mit einer Abmessung von 4 mm · 10 mm. Der Laserstrahl verläßt den Lichtleiter mit einer Apertur von 60°. Durch die Wahl des Abstandes zwischen Lichtleiter und Probe ist es daher möglich, entweder nur den Bereich der Probe zu belichten, der vom Abtaststrahl durchstrichen wird, oder die gesamte Probe gleichmäßig zu belichten.

Der Start der Messung erfolgt durch TTL-Signale vom Laser synchron zur Auskopplung eines Blitzes. Der Laser stellt dabei zwei Signale mit steigender Flanke zur Verfügung. Eines besitzt eine feste Phasenbeziehung zum Laserblitz und wird nur dann ausgegeben, wenn tatsächlich ein Laserstrahl ausgekoppelt wird, während die Flanke des zweiten Signals -500 ns bis +500 ns relativ zum ersten verschoben werden kann. Dieses zweite Signal wird jedesmal ausgegeben, wenn das Lasermedium gepumpt wird. Um eine optimale Synchronisation zwischen Laser und Transientenrekorder zu erreichen, werden die beiden

Signale in einem NAND-Gatter (NG) logisch miteinander verknüpft und der TTL-Pegel invertiert. Die Invertierung des Pegels ist nötig, da der Transientenrekorder mit der fallenden Flanke eines TTL-Signals getriggert wird. Durch diese variable Triggerung ist es möglich, den Transientenrekorder und den Laser mit einer Abweichung von etwa ± 10 ns zu synchronisieren.

Die Steuerung der einzelnen Komponenten, die Meßwerterfassung und die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe eines konventionellen PC (486DX2-66, 8 MB Ram) mit Erweiterungskarten für die Kommunikation über VME-Bus und IEEE-Bus und mit einer Treiberkarte für die Schrittmotoren der beiden Monochromatoren. Alle drei Einsteckkarten belegen je einen ISA-Steckplatz im Computer. Für die Steuerung des Experiments stand von *Thiedemann (1994)* entwickelte Software zur Verfügung, die auf die geänderten Hardwareanforderungen des aufgebauten Spektrometers angepaßt werden mußte. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit die Messung der Anregungsintensität und die Steuerung der Probenentemperierung in das Programm integriert. Des Weiteren wurde das bestehende Programm um eine Stapelverarbeitung erweitert, welche die einzelnen Aktionen im Ablauf des Experiments steuert und somit eine weitestgehende Automatisierung der Messungen ermöglicht.

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, daß der Abtaststrahlengang stark erschütterungsempfindlich ist. Aus diesem Grund wurde das Spektrometer, mit Ausnahme des Lasers, auf einem schwingungsgedämpften optischen Tisch (IsoStation, Newport, Darmstadt) montiert. Der Laser mußte auf einem separaten Tisch montiert werden, da das Kühlsystem des Lasers Schwingungen erzeugt, die auf den optischen Tisch übertragen würden. Der Photoverschluß V1 muß ebenfalls beweglich aufgehängt sein, damit die mechanischen Impulse beim Öffnen und Schließen nicht auf den Tisch übertragen werden. Eine beweglich Aufhängung des Verschlusses V2 ist nicht notwendig, da die Aktionen dieses Verschlusses in einem größeren zeitlichen Abstand zur Aufnahme des Signals erfolgt und die durch diesen Verschluß verursachten Schwingungen bei Beginn der Messungen bereits abgeklungen sind.

6.2 Ablauf der Messungen

Zunächst wird der Photoverschluß V2 geschlossen, der sich im Abtaststrahlengang befindet. Es fällt nun kein Licht auf den Photomultiplier und so kann mit Hilfe des Transientenrekorders die Dunkelspannung U_D bestimmt werden, die sich aus dem Dunkelstrom des Photomultipliers und der Offsetspannung des Vorverstärkers zusammensetzt. Nachdem der Photoverschluß wieder geöffnet ist, kann im Transientenrekorder die Spannung vor der Anregung der Probe U_0 gemessen werden. Die Differenz aus U_D und U_0 ist proportional zur Lichtintensität am Photomultiplier. Um den Auflösungsbereich des Transientenrekorders voll auszunutzen, wird die Spannung U_0 vom Digital–Analog–Wandler erzeugt und am invertierenden Eingang des Transientenrekorders angelegt. Durch diese Kompensation werden anschließend nur noch Abweichungen ΔU von der Spannung U_0 aufgenommen. Im Transientenrekorder wird jetzt die Verstärkung des Eingangsverstärkers eingestellt, die Zeitbasen der einzelnen Segmente programmiert und der Transientenrekorder für den Start der Aufnahme vorbereitet. Nach dem Schließen von Photoverschluß V1 wird dem Laser eine Freigabe erteilt, so daß beim nächsten Pumpen ein Laserblitz ausgekoppelt werden kann, der aber wegen des geschlossenen Photoverschlusses V1 nicht auf die Probe fällt. Gleichzeitig mit dem Blitz startet der Laser über ein TTL–Signal die Aufnahme im Transientenrekorder. Nachdem die Daten vom Transientenrekorder in den Computer eingelesen sind, wird der Photoverschluß V2 geöffnet und eine weitere Transiente mit Laseranregung aufgenommen. Die Aufnahme einer Transienten ohne Anregung der Probe unter ansonsten gleichen Bedingungen dient zur Kompensation von gerätespezifischen Störeinflüssen, insbesondere von induktiven Störungen, die aus dem hohen elektrischen Strom beim Pumpen des Lasers und aus der Netzspannung resultieren. Das korrigierte Signal ergibt sich schließlich als Differenz der Transienten mit und ohne Anregung der Probe.

Da die Prozesse, die nach der Anregung des Bacteriorhodopsins ablaufen, reversibel sind, handelt es sich bei den durchgeführten Versuchen um Relaxationsexperimente. Das System kehrt nach der Anregung wieder in seinen Ausgangszustand zurück. Es ist daher möglich, nach der Relaxation des Systems weitere Meßzyklen zu starten und die einzelnen Messungen zu mitteln. Dadurch läßt sich eine erhebliche Verbesserung des Signal–Rausch–Verhältnisses erreichen. Das Signal–Rausch–Verhältnis steigt dabei proportional zur Wurzel der gemittelten Messungen.

6.3 Eigenschaften des Blitzlicht–Absorptionsspektrometers

Da das Blitzlicht–Absorptionsspektrometer im Rahmen dieser Arbeit aus Einzelkomponenten aufgebaut wurde, mußte eine Reihe von Messungen durchgeführt werden, deren Ergebnisse Rückschlüsse auf die optische und zeitliche Auflösung des Spektrometers zulassen. Außerdem wurden Kalibrierungen des Energiedetektors und des Temperatursensors am Küvettenhalter durchgeführt, da diese beiden Sensoren die von ihnen ermittelten Größen nicht direkt am Probenort messen.

Der Energiedetektor mißt die Energie eines Teiles des Anregungsstrahls, der durch einen Strahlteiler ausgekoppelt und durch eine konvexe Linse aufgeweitet wird, bevor er auf den Energiedetektor trifft. Die andere Hälfte des Anregungsstrahls durchläuft auf dem Weg zur Probe einen Lichtleiter, in welchem das Licht erheblich abgeschwächt wird, so daß die Anregungsenergie am Probenort zwar proportional zur Energie am Detektor ist, aber nicht den gleichen Betrag hat. Durch eine vergleichende Messung der Laserintensitäten am Detektor und am Probenort kann dieses Verhältnis bestimmt und anschließend zur Umrechnung der vom Energiemeter angezeigten Werte auf die Anregungsintensitäten am Probenort benutzt werden.

Die Temperierung der Probe erfolgt über den Küvettenhalter, der an einen Thermostaten angeschlossen ist. Der Thermostat verfügt über zwei Temperaturfühler: Ein interner Fühler mißt die Temperatur des Temperierbades im Thermostaten, während ein externer Fühler am Küvettenhalter angebracht ist und dessen Temperatur aufnimmt. Aufgrund der schlechten Wärmeübertragung vom Thermostaten zum Küvettenhalter ist eine Steuerung des Thermostaten über den externen Temperaturfühler nicht möglich und es herrscht eine Temperaturdifferenz zwischen Temperierbad, Küvettenhalter und Probe. Diese Temperaturdifferenz ist sowohl von der Raumtemperatur als auch von der Temperatur der Probe abhängig. Aus der Bestimmung dieser Temperaturdifferenz kann, bei konstanter Raumtemperatur, aus der gemessenen Temperatur des Küvettenhalters die aktuelle Temperatur der Probe bestimmt werden. Eine sehr viel aufwendigere direkte Temperaturmessung der Probe kann somit entfallen. Außerdem kann mit dieser Abhängigkeit die Temperatur bestimmt werden, die am Thermostaten einzustellen ist, um eine gewünschte Probentemperatur zu erreichen.

Da das Licht des Abtaststrahlenganges bei geeigneter Wellenlänge von der Probe absorbiert wird, kann das Meßlicht die Messung durch eine Anregung des Photozyklus beein-

flussen. Es wurde daher die Intensität des Abtaststrahls am Probenort in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Spaltbreite der Monochromatoren untersucht.

6.3.1 Zeitliche Auflösung des Spektrometers

Wie bei allen Relaxationsmethoden ist auch beim Blitzlichtspektrometer die maximal erreichbare zeitliche Auflösung von der Dauer der Störung abhängig. Da der zur Anregung verwendete Laser eine Halbwertsbreite von 8 ns hat, liegt auch die maximal erreichbare Auflösung in diesem Bereich. Auf der anderen Seite ist die zeitliche Auflösung des Spektrometers durch die Detektions- und Aufnahmeelektronik bestimmt. Alle in den elektronischen Bauteilen vorhandenen Kapazitäten und Impedanzen bilden RC-Glieder und stellen somit Tiefpaßfilter dar, welche die Antwortgeschwindigkeit auf ein Signal begrenzen. Da es sehr schwierig ist, das Ansprechverhalten der Komponenten einzeln zu bestimmen, wird das Ansprechverhalten der gesamten Anlage auf den Anregungspuls untersucht. Dazu wird im Küvettenhalter ein winziger Bruchteil des Anregungslichtes in den Absorptionsstrahlengang gespiegelt und aufgenommen.

Die Abbildung 9 zeigt, daß die zeitliche Auflösung der Elektronik vom Eingangswiderstand des Vorverstärkers abhängt. Aus der Anpassung der Daten mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung läßt sich die zeitliche Auflösung des Spektrometers als Antwort auf einen sehr kurzen Lichtimpuls für die beiden möglichen Eingangswiderstände ermitteln. Sie beträgt für $R = 50 \Omega$: $t = 16 \text{ ns}$ und für $R = 1 \text{ k}\Omega$: $t = 41 \text{ ns}$. Da eine zeitliche Auflösung von 41 ns für die überwiegende Anzahl der Messungen ausreichend ist und der größere Eingangswiderstand ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis bietet (siehe Abschnitt 6.3.2), werden die Messungen in der Regel bei dieser Einstellung ($R = 1 \text{ k}\Omega$) durchgeführt.

Ein weiteres Problem bei der zeitlichen Auflösung des Spektrometers ist die Synchronisation der Anregung mit dem Start der Aufnahme. Das Anregungslicht legt von der Pumpkammer des Lasers bis zur Probe eine Strecke von etwa 3 m zurück. Das Abtastlicht muß bis zur Probe etwa einen Meter zurücklegen und auf dem Weg von der Probe zum Detektor noch einmal einen halben Meter. Bei der Lichtgeschwindigkeit von 300000 km/s liegen die zeitlichen Verschiebungen durch diese räumlichen Distanzen im Zeitbereich von 10 ns. Das elektrische Triggersignal, das im Laser zeitgleich mit der Auskopplung des Laserstrahls erzeugt wird und die Aufnahme im Transientenrekorder startet, muß eine

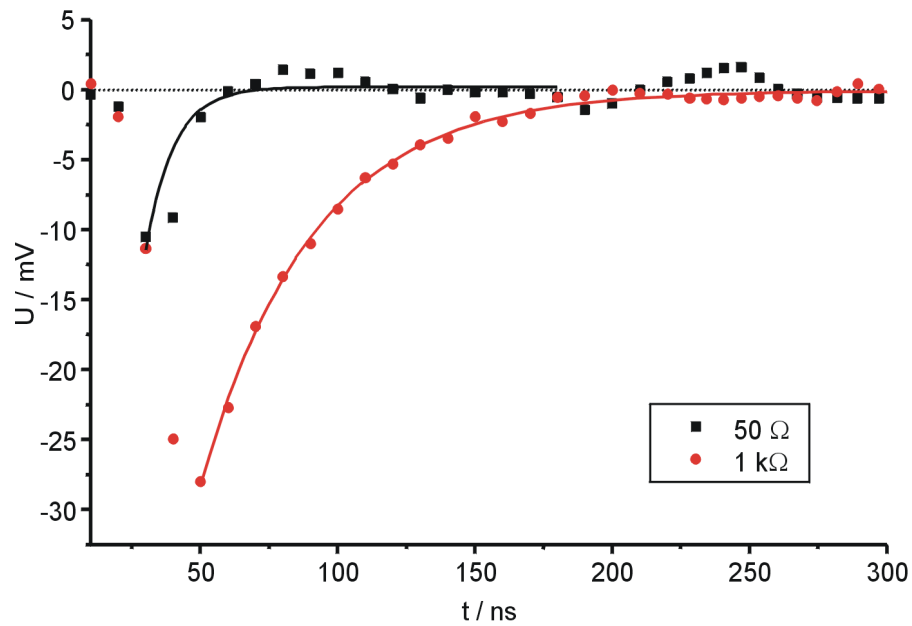


Abbildung 9: Aufnahme der Reflexion eines Laserblitzes mit einer Halbwertsbreite von 8 ns zur Bestimmung des zeitlichen Auflösungsvermögens des Spektrometers. Dargestellt ist das detektierte Spannungssignal bei Eingangswiderständen des Vorverstärkers von $R = 50 \Omega$ und $R = 1 \text{ k}\Omega$. Die Punkte stellen die Meßwerte dar, die durchgezogenen Linien die Anpassung der Werte an eine Exponentialfunktion. Die Aufnahme wurde jeweils 50 ns vor dem Laserblitz gestartet.

ähnliche Distanz zurücklegen. Die Phasengeschwindigkeit des elektrischen Stromes ist jedoch kleiner als die Lichtgeschwindigkeit, und außerdem muß der elektrische Strom noch einige elektronische Schaltungen durchqueren, wodurch er zusätzlich verzögert wird. Eine exakte Synchronisation der Aufnahme mit der Anregung ist daher nur möglich, indem diese Parameter empirisch bestimmt werden und eine Korrektur durchgeführt wird. Diese Korrektur ist möglich, da es der Laser gestattet, das Triggersignal in einem Bereich von -400 ns bis +700 ns relativ zur Auskopplung des Laserstrahls zu verschieben. Dies ist durch das Einschreiben von Werten in ein Register des Lasers, dem „Q-switch-advanced-synchronisation-register“ (Adv.-Sync.-Register) möglich.

Während der Messungen zeigte sich, daß die Phasenbeziehung zwischen Laserpuls und Triggersignal von der eingestellten Energie des Laserpulses (PFN-Voltage-Register) abhängig ist. In das Steuerprogramm wurde deshalb eine Routine eingearbeitet, die bei einer

Änderung der Einstellung der Laserenergie für eine optimale Synchronisation zwischen Laserpuls und Triggersignal sorgt. Um die zur Laserenergie passenden Werte für das Adv.–Sync.–Register zu ermitteln, muß zunächst die Abhängigkeit der Phasenverschiebung von der eingestellten Energie ermittelt werden. Da außerdem die Herstellerangaben zum Adv.–Sync.–Register falsch waren, mußte auch die Auswirkung dieses Registerinhalts auf die Phasenverschiebung gemessen werden.

6.3.2 Signal–Rausch–Verhältnis

Das Signal–Rausch–Verhältnis des Spektrometers ist von mehreren Faktoren abhängig. Dazu zählen elektronische, physikalische und statistische Ursachen. Die einzelnen Rauschquellen können sich dabei je nach ihrer Natur in unterschiedlichen Frequenzbereichen verschieden stark bemerkbar machen.

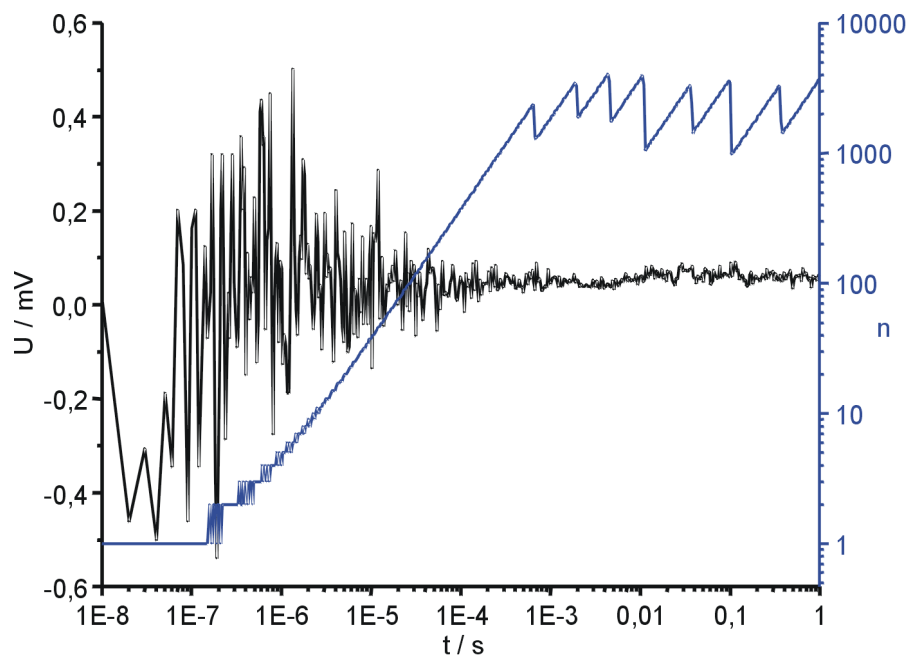


Abbildung 10: Elektronisches Rauschsignal des Blitzlichtspektrometers ohne Abtastlicht (linke Skala, schwarze Linie) und Anzahl der Meßwerte n , aus denen sich ein Meßpunkt zusammensetzt (rechte Skala, blaue Linie).

Die Auswirkung des im Signal enthaltenen Rauschens auf die Meßkurve wird stark von der Verarbeitung der Daten im Computer beeinflusst. Die zunächst im Transientenrekorder

aufgenommenen Punkte der acht sequentiellen, linearen Zeitachsen werden im Rechner auf eine logarithmische Zeitachse gemittelt. Zu Beginn einer jeden linearen Zeitachse werden daher weniger Meßwerte zur Mittelung eines Meßpunktes herangezogen als am Ende des linearen Bereiches. Aufgrund der begrenzten Aufnahmefrequenz des Transientenrekorders können die acht linearen Zeitachsen auch nicht gleichmäßig auf die gesamte logarithmische Zeitskala verteilt werden. Schon vom ersten Segment des Transientenrekorders wird der Zeitbereich von 10 ns bis 655 μ s abgedeckt. In diesem Bereich können daher nur sehr viel weniger Meßwerte zur Berechnung eines Meßpunktes herangezogen werden als in den größeren Zeitbereichen. Die Anzahl der Meßwerte, die zur Berechnung eines Meßpunktes herangezogen werden, ist in Abbildung 10 dargestellt. Bei den letzten sieben Zeitachsen besteht ein Meßpunkt zu Beginn aus 1000 bis 2000 und am Ende der Zeitachse aus 3000 bis 4000 Meßwerten. Bei der ersten Zeitachse ist diese Differenz noch größer. Hier basiert ein Meßpunkt zu Beginn der Zeitachse auf einem Meßwert und am Ende der Zeitachse auf 2500 Meßwerten. Die Mittelung der Meßwerte auf eine logarithmische Zeitachse wirkt sich somit wie ein dynamischer Tiefpaßfilter auf die Messung aus. Zu größeren Zeiten hin werden zunehmend höhere Frequenzanteile aus dem Signal herausgefiltert. Als Resultat erhält man ein Rauschsignal, dessen Amplitude zu größeren Zeiten hin proportional zur Wurzel der Anzahl der gemittelten primären Meßpunkte kleiner wird. Störsignale mit einer definierten Frequenz machen sich nur in dem Zeitbereich bemerkbar, der dieser Frequenz entspricht. Bei kleineren Zeiten beobachtet man eine Abweichung von der Nulllinie, bei größeren Zeiten werden diese Störsignale herausgefiltert.

Für den größten Anteil des Rauschens können elektronische Bauteile verantwortlich gemacht werden. Da das Verstärkungsverhältnis des Vorverstärkers konstant gehalten wird und die Verstärkung am Eingang des Transientenrekorders nur in einem engen Bereich variiert wird, kann der absolute Betrag des Rauschens durch die Elektronik als nahezu konstant angesehen werden. Die Auswirkung auf das Signal-Rausch-Verhältnis wird somit nur von der Größe des Lichtsignals bestimmt. Der Frequenzbereich des elektronischen Rauschens überstreicht dabei den gesamten Auflösungsbereich des Spektrometers. Vermindert man diesen Frequenzbereich durch die Erhöhung der Eingangsimpedanz des Vorverstärkers, so werden alle Rauschfrequenzen, die größer sind als die Grenzfrequenz, herausgefiltert und das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert sich insgesamt. Dies geht aber, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, zu Lasten der zeitlichen Auflösung des Spektrometers. Der Einfluß des elektronischen Rauschens auf das Signal bei verschiedenen Lichtintensitäten ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur Spannung U_0 am Eingang des Transientenrekorders.

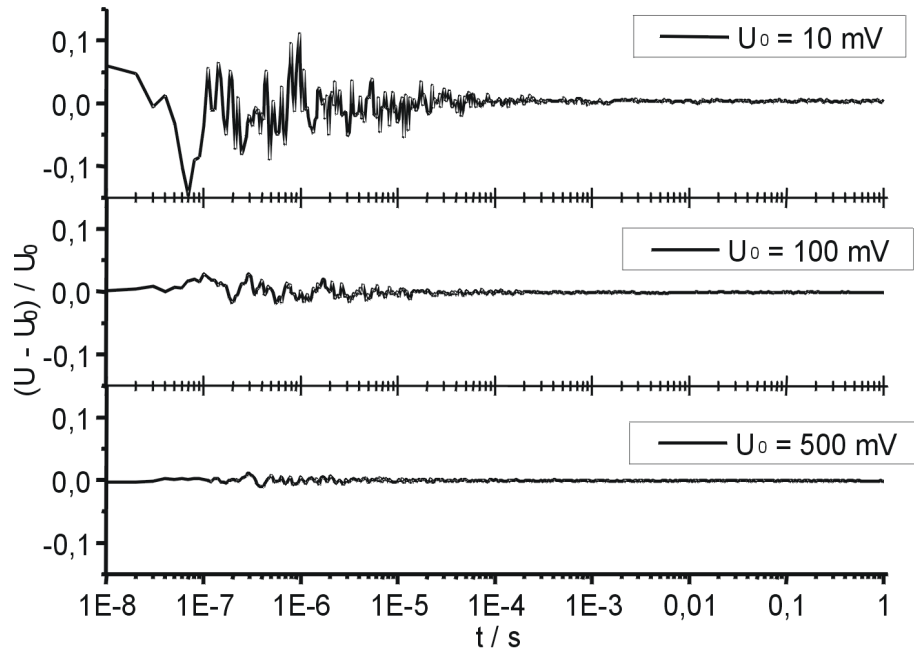


Abbildung 11: *Signal-Rausch-Verhältnis des Spektrometers, normiert auf die Größe des Spannungssignals am Eingang des Transientenrekorders. Die in der Abbildung angegebenen Spannungen U_0 sind proportional zur Lichtintensität am Detektor.*

Eine weitere Rauschquelle ist in dem Abtaststrahlengang zu suchen. Das Netzgerät, das die Xenonlampe des Abtaststrahlenganges speist, wird mit Wechselstrom betrieben. Trotz Glättung bleibt ein Rest an Stromschwankungen übrig, der von der Bogenlampe aufgrund ihrer geringen Trägheit in hohem Maße als Intensitätsschwankung weitergegeben wird. Dieses Rauschen kann sich als eine gleichförmige Schwingung mit einer Frequenz von 100 Hz bemerkbar machen. Zusätzlich tritt im ns-Bereich ein Photonenrauschen auf. Bei einer Leistung des Abtaststrahls am Probenort von $1 \mu\text{W}$ fließen hier bei einer Wellenlänge von 532 nm etwa $25 \cdot 10^{12}$ Photonen pro Sekunde. Bei einer optischen Dichte der Probe von $OD = 1$ und einem Verlust im zweiten Monochromator von 50 % erreicht den Photomultiplier nur noch ein Photonenstrom von 125 Photonen pro ns, was zu einem statistischen Rauschen im ns-Bereich führt.

Es stellte sich heraus, daß der Absorptionsstrahlengang extrem erschütterungsempfindlich ist. Dies macht sich in einem sinusförmigen Störsignal mit einer Frequenz von 100 Hz bemerkbar. Die Höhe der Frequenz wird dabei von der Resonanzfrequenz des Tisches bestimmt, auf dem das Spektrometer montiert ist. Aufgrund der Verarbeitung des Signals

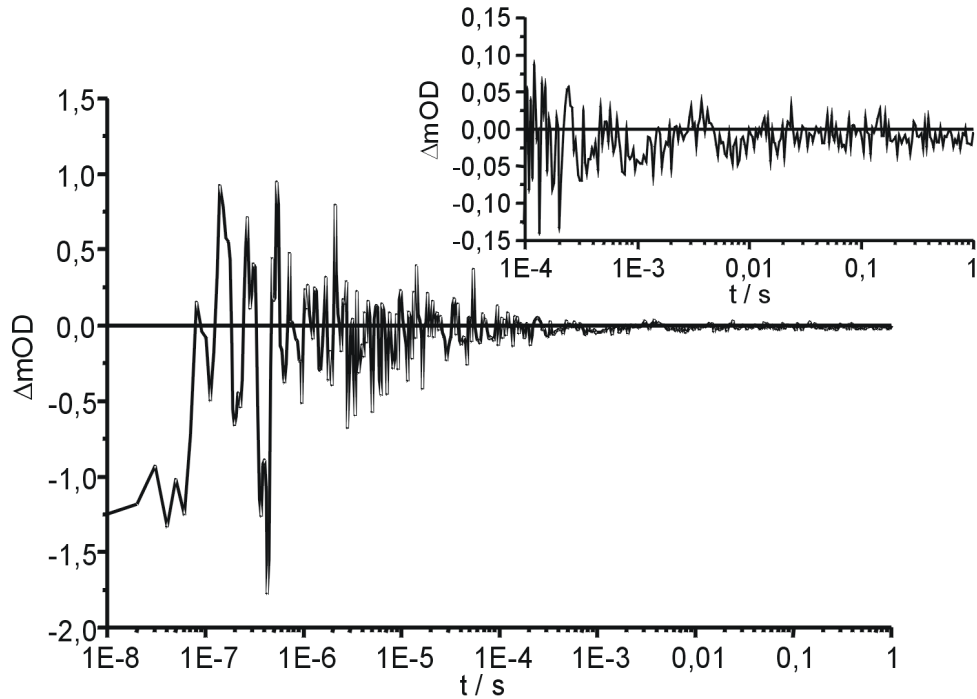


Abbildung 12: Auswirkung des Rauschens auf das ΔOD -Signal bei 36 gemittelten Messungen und Einhaltung der Nulllinie (Inset: Spreizung der Ordinate für den Zeitbereich von 10^{-4} s bis 1 s). Das Signal wurde ohne Probe bei einer Photomultiplierspannung von $U_0 = 250$ mV aufgenommen.

im Computer ist diese Störung in einem Zeitbereich von 10^{-4} s bis 10^{-2} s im Spektrum zu erkennen (nicht dargestellt). Die Erschütterungen können dabei von außen auf das Spektrometer übertragen werden, aber auch von Komponenten des Spektrometers, wie den Photoverschlüssen oder dem Laser, verursacht sein.

Ein typisches Rauschsignal, welches unter günstigen Bedingungen (36 gemittelte Messungen, $U_0 = 250$ mV) im Differenz-Absorptionssignal enthalten ist, und die Einhaltung der Nulllinie ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Amplitude des Rauschens beträgt im Zeitbereich unterhalb einer Mikrosekunde weniger als 2 mOD und fällt oberhalb einer Millisekunde auf weniger als $100 \mu OD$ ab. Die Abweichung von der Nulllinie beträgt in diesem Zeitbereich sogar weniger als $50 \mu OD$. Bei Proben mit einer hohen optischen Dichte ist die Eingangsspannung am Transientenrekorders kleiner und die Auflösung des Spektrometers wird entsprechend schlechter.

Die Intensität des Laserstrahls ist Schwankungen unterworfen. Selbst unter optimalen

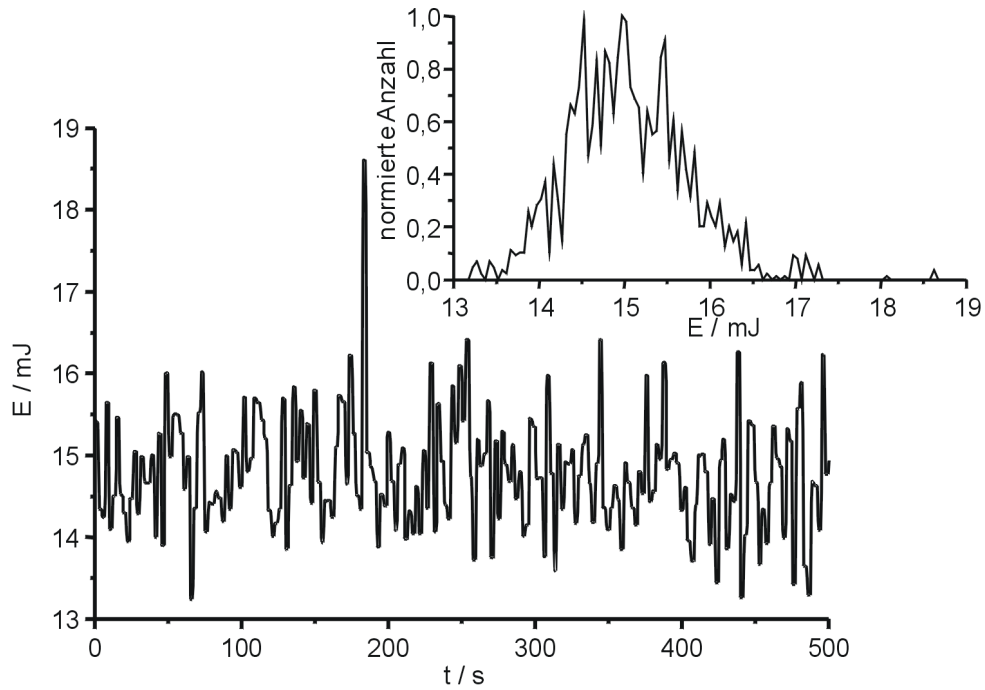


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Anregungsintensität. Jede Stufe in der Kurve entspricht einem Laserpuls. (Inset: Verteilung der relativen Häufigkeiten der Energie.)

Betriebsbedingungen weicht die Energie aufeinanderfolgender Laserblitze um bis zu 15 % voneinander ab. Durch ungünstige Betriebsbedingungen wie einer schwankenden Umgebungstemperatur werden diese Abweichungen zusätzlich verstärkt. Da die emittierte Intensität von der Betriebstemperatur des Lasers abhängt, ist es nötig, den Laser mindestens 30 min vor der Messung zu starten, um ihn auf eine konstante Betriebstemperatur zu bringen. Außerdem sollte die Umgebungstemperatur durch Klimatisierung des Raumes konstant gehalten werden. Aber auch unter optimalen Bedingungen bestehen Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Blitzen. In Abbildung 13 ist der zeitliche Verlauf der Anregungsintensität während einer Messung dargestellt. Die Intensität schwankt dabei statistisch um einen Mittelwert. Um diese Abweichungen zu kompensieren, müssen immer mehrere Meßzyklen gemittelt werden.

6.3.3 Leistung des Abtaststrahls

Um eine hohe zeitliche Auflösung des Spektrometers zu erreichen, muß die Intensität des Abtaststrahls sehr viel größer sein als in einem herkömmlichen Absorptionsspektrometer. Auf der anderen Seite besteht die Gefahr, daß die Messung durch die große Intensität des Abtaststrahls beeinflusst wird. Zum einen wird bei entsprechender Wellenlänge ständig BR im Grundzustand angeregt und durchläuft den Photozyklus und zum anderen können die Zwischenzustände im Photozyklus Photonen absorbieren und in andere Reaktionsfolgen verzweigen. Bei Messungen an Vesikeln ist außerdem zu beachten, daß bei einer Anregung des BR durch den Abtaststrahl Protonen und damit auch Ladung über die Membran transportiert werden, was zu einer unerwünschten Polarisierung der Membran führt. Die Leistung des Abtaststrahls muß so niedrig eingestellt werden, daß der aus der Anregung des Pumpzyklus resultierende Aufbau eines elektrochemischen Gradienten langsamer ist als die Depolarisierung der Membran durch einen passiven Rückfluß der Protonen.

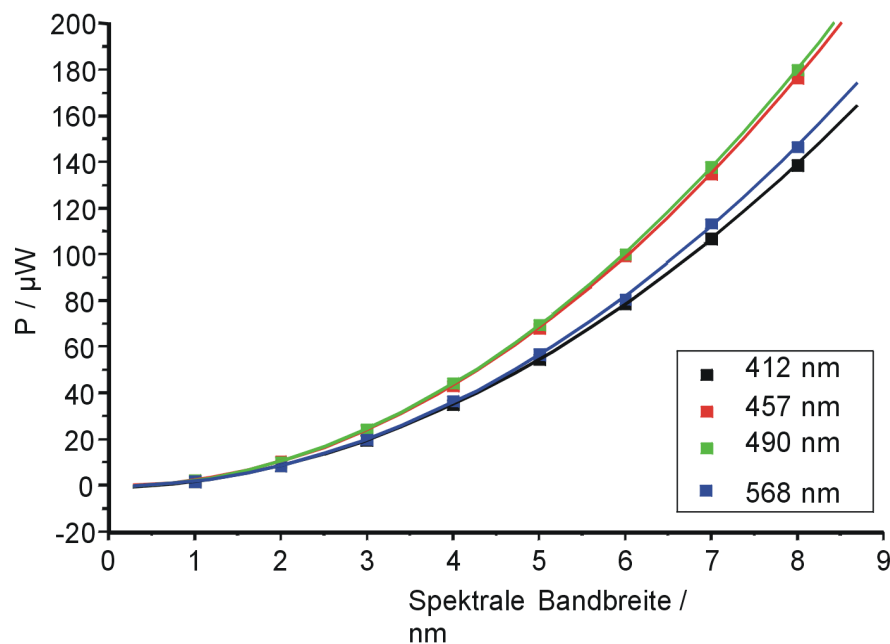


Abbildung 14: Leistung des Abtaststrahlenganges am Probenort bei den häufig benutzten Wellenlängen 412 nm, 457 nm, 490 nm und 568 nm in Abhängigkeit von der Spaltbreite am Monochromator M 1.

Das Ausmaß der Beeinflussung der Messung durch das Abtastlicht hängt dabei sowohl von der Leistung des Lichtes als auch von der Lebensdauer der angeregten Zustände bzw. der Gesamtdauer des Photozyklus und von den Extinktionskoeffizienten der beteiligten

Spezies ab. Eine Aussage über die Beeinflussung der Messung durch das Abtastlicht liefert daher ein Vergleich der aus dem Anregungslicht absorbierten Photonen mit der Anzahl an Photonen, die die einzelnen Zwischenzustände aus dem Abtaststrahl absorbieren.

Da die Leistung der Lichtquelle im Abtaststrahlengang konstant ist, hängt die Lichtintensität in der Probe nur von der Einstellung der Spaltbreite am ersten Monochromator (M1) und von der Wellenlänge ab. Die Leistung des Abtaststrahls am Probenort bei den für die Messungen wichtigsten Wellenlängen ist in Abbildung 14 dargestellt.

6.3.4 Temperierung der Probe

Auf dem Weg des Kühlmittels vom Temperierbad zum Küvettenhalter findet ein Wärmeaustausch mit der Umgebung statt. Die Temperatur des Küvettenhalters weicht daher von der eingestellten Temperatur des Thermostaten ab. Aufgrund des schlechten Wärmeüber-

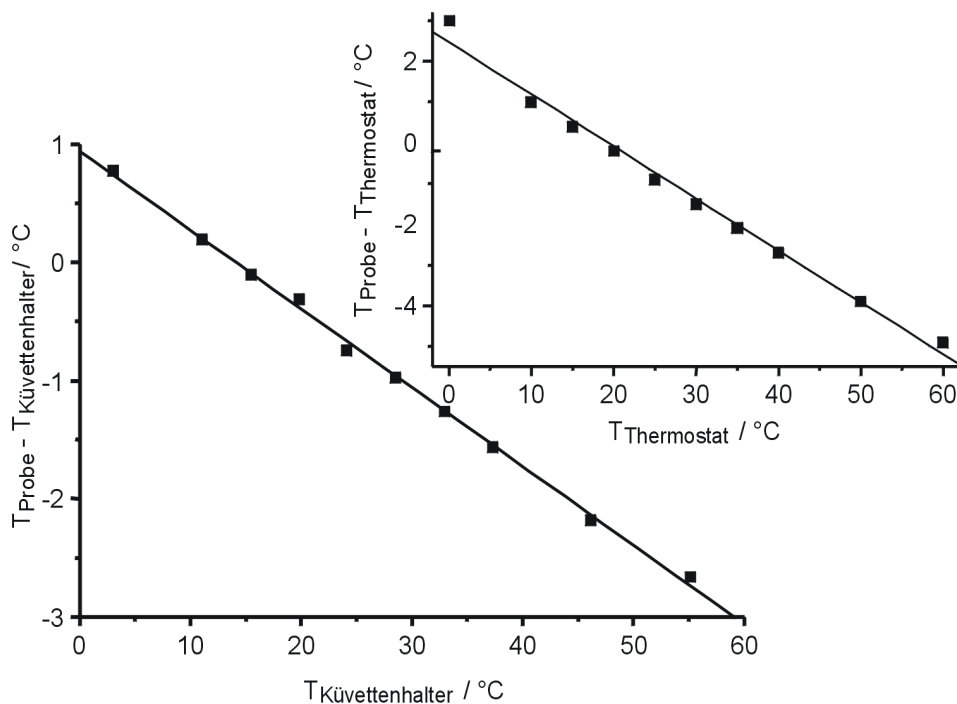


Abbildung 15: Temperaturdifferenz zwischen Küvettenhalter und Probe in Abhängigkeit von der Temperatur des Küvettenhalters bei einer Raumtemperatur von 21°C (Inset: Abhängigkeit der Temperaturdifferenz zwischen Temperierbad und Probe von der Temperatur des Temperierbades).

ganges vom Küvettenhalter auf die Küvette existiert zudem ein Temperaturunterschied zwischen diesen beiden Komponenten, welcher von der Umgebungstemperatur abhängig ist. Da der Raum, in dem sich das Spektrometer befindet, ständig auf 21 °C klimatisiert wird, besteht eine definierte Abhängigkeit zwischen interner Badtemperatur des Thermostaten, der Temperatur des Küvettenhalters und der Temperatur der Probe. Aus den in Abbildung 15 dargestellten Abhängigkeiten der Temperaturen von Küvettenhalter, Probe und Temperierbad läßt sich aus der gemessenen Temperatur des Küvettenhalters die Temperatur der Probe berechnen. Aus der ebenfalls dargestellten Abhängigkeit zwischen interner Badtemperatur und Proben temperatur läßt sich der Wert berechnen, der am Thermostaten eingestellt werden muß, um eine gewünschte Temperatur der Probe zu erreichen.

Nach der Ausgleichsgeraden aus Abbildung 15 ergibt sich eine Proben temperatur T_{Probe} in Abhängigkeit von der Temperatur des Küvettenhalters $T_{Kuev.}$ von:

$$T_{Probe} = 0,88^{\circ}\text{C} + 0,937 \cdot T_{Kuev.} . \quad (24)$$

Für die einzustellende Temperatur des Thermostaten $T_{Thermos.}$ in Abhängigkeit von der gewünschten Proben temperatur T_{Probe} ergibt sich:

$$T_{Thermos.} = -2,81^{\circ}\text{C} + 1,146 \cdot T_{Probe} . \quad (25)$$

Diese Gleichung wurde bei allen temperaturabhängigen Messungen zur Berechnung der Proben temperatur aus den aufgezeichneten Temperaturen des Küvettenhalters benutzt.

6.4 Pyranin und Carboxyfluorescein als pH-Indikatoren

Für die Untersuchung der Protonentranslokation mit Hilfe der transienten Absorptionsspektroskopie haben sich die beiden optischen pH-Indikatoren 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (Pyranin) (Grzesiek & Dencher, 1986; Kano & Fendler, 1978; Seigneuret & Rigaud, 1985, 1987; Wolfbeis et al. 1983) und 5(6)-Carboxyfluorescein als besonders günstig herausgestellt (Heberle, 1991). Die Strukturformeln beider Verbindungen sind in Abbildung 16 dargestellt.

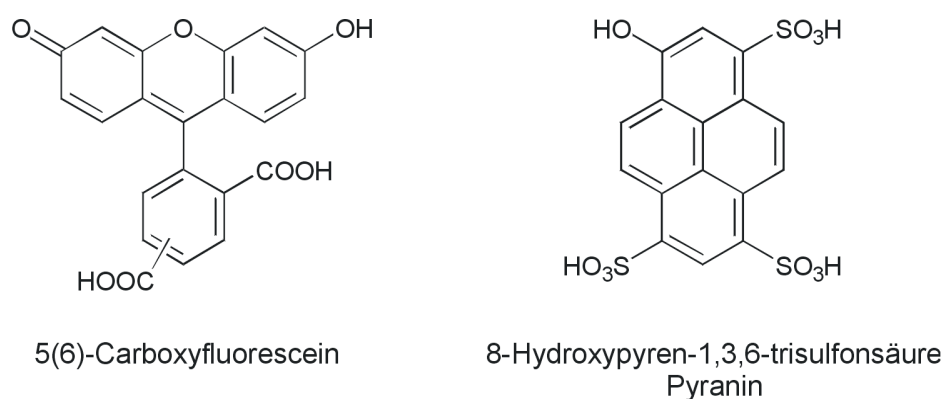


Abbildung 16: Strukturformeln der protonierten Formen der optischen pH-Indikatoren 5(6)-Carboxyfluorescein und Pyranin.

6.4.1 Pyranin

Die drei Sulfonsäuregruppen des Pyranins sind stark sauer (vgl: pK-Wert von Benzolsulfonsäure: 0,70; Beyer & Walter, 1991) und liegen unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor. Der pK-Wert der Hydroxylgruppe des Pyranins läßt sich aus pH-abhängigen Absorptionsspektren nach Formel 11 (Seite 12) berechnen. Aus den in Abbildung 17 dargestellten Spektren für eine KCl-Konzentration von 150 mM, und aus zwei weiteren Meßreihen bei Salzkonzentrationen von 0 mM KCl und 1 M KCl ergibt sich für die Hydroxylgruppe des Pyranins bei 22 °C ein pK-Wert von $pK = 7,80$ in einem salzfreien Medium, ein pK-Wert von 7,17 in 150 mM Kaliumchloridlösung und in 1 M Kaliumchloridlösung fällt der pK-Wert auf 6,95. Die Abhängigkeit des pK-Wertes des Pyranins von der Ionenstärke der Lösung wurden bereits von mehreren Autoren untersucht (Schmid, 1996; Heberle, 1991; Verclas, 1998; Grzesiek & Dencher, 1986). Die in der Literatur aufgeführten

pK-Werte des Pyranins bei verschiedenen Salzkonzentrationen stimmen innerhalb einer Fehlertoleranz von $\pm 0,1$ pK mit den eigenen Messungen überein.

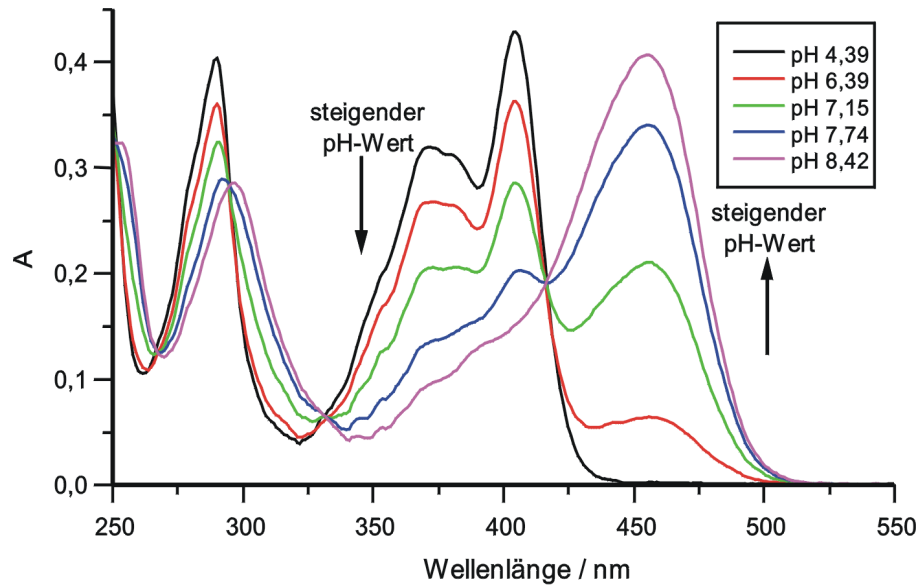


Abbildung 17: Absorptionsspektren von Pyranin bei verschiedenen pH-Werten. $T = 22^\circ\text{C}$, $c = 25 \mu\text{M}$, $d = 1 \text{ cm}$, 150 mM KCl .

Aus den in Abbildung 17 dargestellten Daten ergibt sich für die im alkalischen Medium vorherrschende, deprotonierte Form des Pyranins ein Absorptionsmaximum bei 457 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $21\,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Der maximale $\frac{\partial \epsilon}{\partial \text{pH}}$ -Wert dieser Absorptionsbande beträgt $10\,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ beim pK-Wert bei einer Wellenlänge von 457 nm . Bei 404 nm befindet sich das Maximum einer weiteren pH-abhängigen Absorptionsbande, die im sauren Medium ihre maximale Absorption aufweist. Der Extinktionskoeffizient der protonierten Form des Pyranins bei 404 nm ist zwar ähnlich groß wie der Extinktionskoeffizient der deprotonierten Form des Pyranins bei 457 nm , aufgrund der geringeren pH-Sensitivität ist diese Absorptionsbande weniger zur Messung der Protonentranslokation geeignet. Pyranin besitzt bei 416 nm einen isosbestischen Punkt, mit dessen Hilfe sich die Konzentration des Indikators in wässriger Lösung bestimmen läßt.

Der größte Vorteil von Pyranin bei der Messung der Protonentranslokation liegt darin, daß der Photozyklus des Bacteriorhodopsins (Abschnitt 3.6.2, Seite 18 f.) in der Purpurmembran im Wellenlängenbereich um 460 nm nur geringe Absorptionsänderungen aufweist. Abweichungen der Kinetik des Photozyklus wirken sich bei der Differenzbildung zur Isolierung des Indikatorsignals deshalb nur minimal auf das Protonierungssignal aus.

Durch die drei- bis vierfach negative Ladung ist das Pyranin sehr gut wasserlöslich und wird von der ebenfalls netto negativ geladenen Membran abgestoßen. So kann man sicher davon ausgehen, daß Pyranin nur die Protonen in der wäßrigen Phase detektiert. Protonen, die an der Oberfläche einer Membran freigesetzt werden, können mit Pyranin erst dann nachgewiesen werden, wenn ein Austausch mit dem umgebenden wäßrigen Medium stattgefunden hat.

Bei der Lichtanregung von Pyranin verringert sich drastisch der pK-Wert der Hydroxylgruppe während der Lebensdauer des angeregten Zustandes. Pyranin kann daher, entgegengesetzt zu den in dieser Arbeit dargestellten Messungen, benutzt werden, um durch Laser-Blitzlichtanregung des Pyranins Protonen in der wäßrigen Phase freizusetzen und die Protonierung von Proteinen aus der wäßrigen Phase zu untersuchen (*Gutman, 1986*).

6.4.2 Carboxyfluorescein

5(6)-Carboxyfluorescein ist ein zweibasiger pH-Indikator mit aus Abbildung 18 ermittelten pK-Werten von $pK_1 = 3,45$ (Carboxylgruppe in 3-Stellung) und $pK_2 = 6,30$ (Hydroxylgruppe) in 150 mM KCl-Lösung. Auch die pK-Werte von 5(6)-Carboxyfluorescein sind von der Ionenstärke abhängig. Aus Spektren analog zu Abbildung 18 ohne KCl ergeben sich pK-Werte von $pK_1 = 3,91$ und $pK_2 = 6,71$ und bei einer Konzentration von 1 M KCl ergeben sich pK-Werte von $pK_1 = 3,58$ und $pK_2 = 6,25$. Der für Messungen unter physiologischen Bedingungen entscheidende pK_2 -Wert liegt damit etwa 0,9 pH-Einheiten unter dem pK-Wert des Pyranins.

5(6)-Carboxyfluorescein besitzt im sichtbaren Bereich des Spektrums zwei pH-abhängige Absorptionsbanden. Eine Bande bei 490 nm, für die sich aus den in Abbildung 18 dargestellten Daten ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 69\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ im alkalischen Milieu für die deprotonierte Form des Indikators berechnet. Eine weitere Absorptionsbande liegt bei 435 nm, mit einem Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 31\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ergibt. Letztere kann dem Fluorescein mit einer protonierten Hydroxylgruppe zugeordnet werden kann. Der Vorteil von Fluorescein ist seine extrem große pH-Sensitivität von $\frac{\partial\varepsilon}{\partial pH} = 20\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}\text{ pH}^{-1}$ bei $\text{pH} = pK_2$. Diese ist damit etwa doppelt so groß wie die pH-Sensitivität von Pyranin. Dadurch kann Fluorescein in kleineren Konzentrationen eingesetzt werden als Pyranin. Carboxyfluorescein ist aber weniger gut wasserlöslich als Pyranin und unter physiologischen Bedingungen nicht so stark negativ geladen.

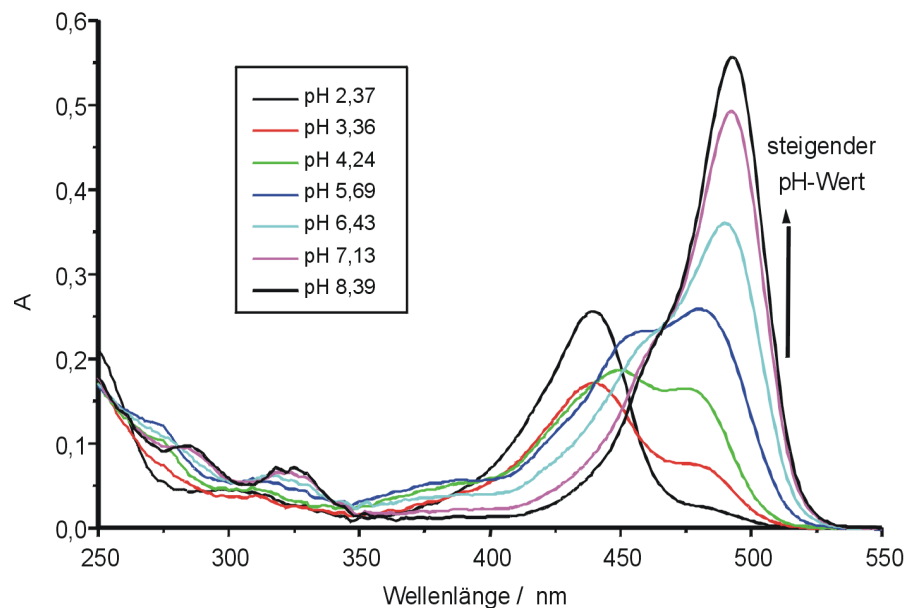


Abbildung 18: Absorptionsspektren von 5(6)-Carboxyfluorescein bei verschiedenen pH-Werten. $T = 20^{\circ}\text{C}$, $c = 10\ \mu\text{M}$, $d = 1\ \text{cm}$, $150\ \text{mM KCl}$.

Die pH-Sensitivität von Carboxyfluorescein als zweibasigem Indikator fällt im pH-Bereich von 3 – 7 weniger stark ab als beim Pyranin, wodurch sich Carboxyfluorescein auch für Messungen in einem leicht sauren Medium eignet. Ein Nachteil dieses Indikators ist, daß der Photozyklus des Bacteriorhodopsins bei 490 nm erhebliche Absorptionsänderungen aufweist. Da das Indikatorsignal bei der kinetischen Absorptionsspektroskopie immer als Überlagerung mit dem Photozyklussignal gewonnen wird, kann dies zu Fehlern bei der Subtraktion der beiden Signale führen. Außerdem besitzt 5(6)-Carboxyfluorescein bei 532 nm eine geringe Absorption, die jedoch groß genug ist, um bei der Anregung des Photozyklus mit einem Laser dieser Wellenlänge eine erhebliche Fluoreszenzemission auszulösen. In einem Zeitbereich bis etwa 100 ns nach der Anregung übertrifft die Intensität der Fluoreszenz sogar die Intensität des Abtaststrahls und führt damit zu meßtechnischen Schwierigkeiten bei Messungen in einem Wellenlängenbereich oberhalb von 532 nm. Durch Untersuchung der Absorptionsänderungen einer Carboxyfluorescein-Probe nach der Laseranregung konnte *Heberle (1991)* jedoch ausschließen, daß Carboxyfluorescein die Messung nach der Laseranregung durch eine lichtinduzierte Protonenfreisetzung beeinflusst.

6.5 Differenzbildung zur Isolierung des Indikatorsignals

Das Indikatorsignal wird immer als eine Überlagerung mit dem Photozyklussignal gewonnen. Änderungen der Kinetik des Bacteriorhodopsins zwischen den beiden zur Differenzbildung herangezogenen Messungen wirken sich immer auch auf das gemessene Indikatorsignal aus. Je größer dabei die Amplitude des Photozyklussignals im Verhältnis zur Amplitude des Indikatorsignals ist, desto stärker resultieren Fehler bei der Bestimmung des Indikatorsignals aus Abweichungen der Photozykluskinetik. Bei den Vesikeln ist das Verhältnis von Indikatorsignal zu Photozyklussignal kleiner als bei der Purpurmembran (Abbildung 19). Verursacht wird dies dadurch, daß bei den Vesikeln nicht alle Protonen an das äußere Medium abgegeben werden, in welchem sich der Indikator befindet. Zusätzlich wird die Amplitude des Indikatorsignals bei Vesikeln durch die höhere Pufferkapazität aufgrund der enthaltenen Lipide reduziert. Insgesamt führt dies bei der Bestimmung der Protonentranslokation an Vesikeln zu einem größeren Fehler als bei der Purpurmembran. In Abbildung 19 sind die Unterschiede zwischen Purpurmembran (A) und Vesikel (B) bei der Isolierung des Pyraninsignals dargestellt. Bei 457 nm ist die Amplitude des Photozyklussignals (schwarze Linie) der Purpurmembran kleiner als die von Bacteriorhodopsin in Vesikeln. Das Indikatorsignal hingegen ist bei der Purpurmembran größer als bei den Vesikeln, bei denen sich das Signal zusätzlich auf eine positive und eine negative Amplitude aufteilt.

Als Ursache für Variationen der Photozykluskinetik kommen Schwankungen der Systemumgebung, wie der Temperatur oder des pH-Wertes, in Frage. Wechselwirkungen des Bacteriorhodopsins mit zugegebenen Indikator- oder Puffersubstanzen können die Kinetik des Photozyklus ebenfalls beeinflussen. Auch die Intensität des Anregungsblitzes wirkt sich auf die erhaltenen transienten Absorptionsänderungen aus. Der zur Anregung verwendete Laser weist Schwankungen in der Impulsintensität auf (Abschnitt 6.3.3). Die mittlere Abweichung der Intensität zweier aufeinander folgender Laserpulse liegt laut Spezifikation bei ca. 3 %. Die Drift der Laserenergie über einen Zeitraum von acht Stunden bei ca. 5 %. Diese langsame Drift der Laserenergie wird bei einer Schwankung der Raumtemperatur noch größer. Im folgenden wird detaillierter auf die Einflüsse der Anregungsenergie und mobiler Puffer auf die Differenzbildung eingegangen.

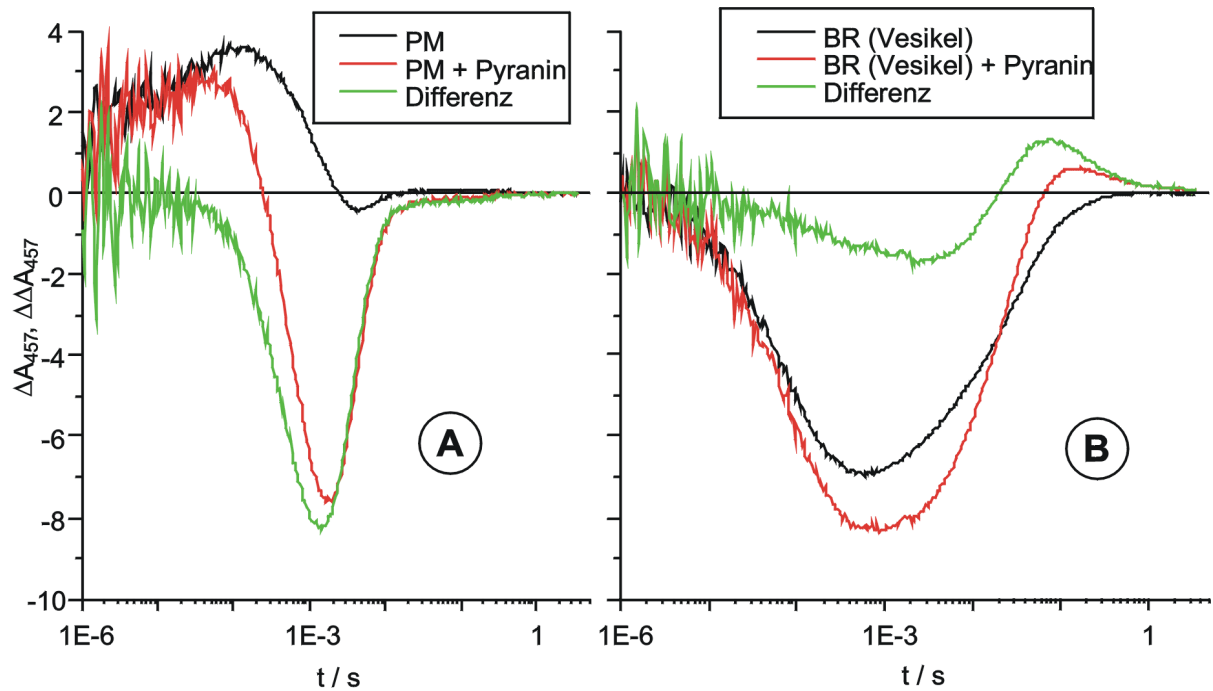


Abbildung 19: Differenzbildung zur Gewinnung des Indikatorsignals im Vergleich zwischen Bacteriorhodopsin in der Membran von Vesikeln (B) und in der Purpurmembran (A). Die schwarze Linie stellt das Photozyklussignal des Bacteriorhodopsins dar, die rote Linie das überlagerte Signal aus Photozyklus- und Indikatorsignal und die grüne Linie die Differenz dieser beiden, das Indikatorsignal.

6.5.1 Einfluß der Anregungsenergie auf die Differenzbildung

In der Literatur (Dancsházy & Tokaji, 1993; Papp et al., 1998; Szundi & Stockenius, 1989; Tokaji, 1993; Váró et al., 1996) ist beschrieben, daß die Kinetik des Photozyklus bei verschiedenen Bedingungen von der Anregungsenergie beeinflusst wird. Diese Effekte sind aber nur zu erwarten, wenn der Anteil der angeregten Bacteriorhodopsin-Moleküle in einer Probe so hoch ist, daß zwei benachbarte Bacteriorhodopsin-Moleküle gleichzeitig angeregt werden und miteinander wechselwirken. Bei geringer Anregungsenergie ist die Wahrscheinlichkeit, daß zwei benachbarte Bacteriorhodopsin-Moleküle gleichzeitig angeregt werden, sehr klein. Eine von der Anregungsenergie abhängige Kooperativität der Photozykluskinetik ist daher bei geringen Anregungsenergien nicht zu erwarten. Eine Schwankung der Anregungsenergie sollte sich daher nur auf die Amplitude, nicht aber auf die Kinetik des Photozyklussignals auswirken. Zwei mit unterschiedlicher Anregungsenergie

gie aufgenommene zeitaufgelöste Spektren einer Probe sollten daher nach Anpassung der Amplituden keine Differenz mehr aufweisen. Diese Eigenschaft des Systems kann ausgenutzt werden, um Fehler, die aus der Drift der Anregungsenergie und der Änderung der Umgebungsbedingungen herrühren, zu minimieren: Die zur Messung der Protonentranslokation eingesetzten Indikatoren zeigen bei einer Wellenlänge von 568 nm keine Absorption. Das transiente Absorptionssignal bei dieser Wellenlänge sollte daher von der Zugabe von Puffer oder Indikatoren unbeeinflusst sein und nur die Auswirkungen der Umgebung und der Anregungsenergie auf den Photozyklus des Bacteriorhodopsins widerspiegeln. Geht man weiter davon aus, daß sich diese Einflüsse auf die Kinetik des Photozyklus bei allen Wellenlängen in gleicher Weise auswirken, dann kann man das transiente Absorptionssignal bei einer Wellenlänge von 568 nm zur Skalierung der beiden für die Differenzbildung nötigen Messungen benutzen.

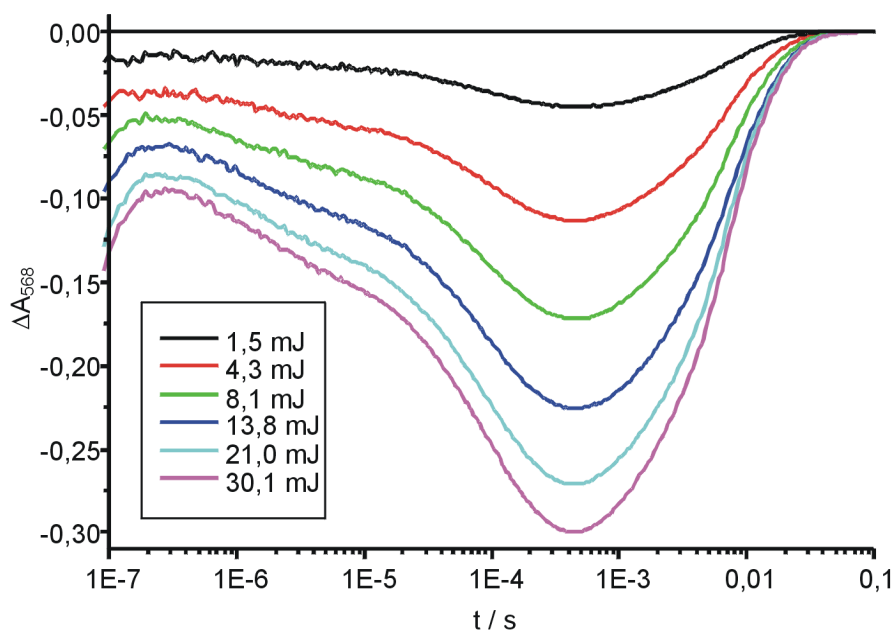


Abbildung 20: *Transiente Absorptionsänderungen der Purpurmembran bei 568 nm in Abhängigkeit von der Anregungsintensität. ($c(\text{BR}) = 17,5 \mu\text{M}$, $A_0 = 1,1$, 150 mM KCl, pH 6,9, 20°C)*

In Abbildung 20 sind die transienten Absorptionsänderungen bei einer Wellenlänge von 568 nm nach Anregung mit Intensitäten von 1,5 mJ bis 30,1 mJ dargestellt. Wie zu erwarten, ist der prozentuale Anteil der angeregten Bacteriorhodopsin-Moleküle und damit auch die Amplitude der transienten Absorptionsänderungen stark von der Anregungsintensität abhängig. Die Amplituden der Absorptionssignale gehen von 48,4 mOD bei

1,5 mJ bis zu 322,5 mOD bei 30,1 mJ. Aus der Konzentration des Bacteriorhodopsins in der Probe von $17,5 \mu\text{M}$ ergibt sich aus den transienten Absorptionsänderungen, daß bei der höchsten Anregungsenergie ca. 25 % der Bacteriorhodopsin-Moleküle den Photozyklus durchlaufen.

Obwohl die Amplituden der Absorptionssignale unter diesen Bedingungen einen sehr großen Bereich überstreichen, kann die Kinetik des Photozyklus als konstant angesehen werden: Skaliert man die transienten Absorptionsänderungen bei 568 nm der verschiedenen Anregungsintensitäten so aufeinander, daß deren Differenz minimal wird, dann werden mit dem gleichen Faktor auch die transienten Absorptionsänderungen bei 457 nm und 490 nm so aufeinander skalierte, daß auch deren Differenz minimal ist. Zur Durchführung dieser Skalierung wird zunächst die Differenz der 568 nm-Signale berechnet, wobei das Signal der Referenzmessung vor der Differenzbildung mit einem Skalierungsfaktor f multipliziert wird $\left(\int_{t=0}^{\infty} [A_{\text{Messung}}(t) - f \cdot A_{\text{Referenz}}(t)] \right)$. Durch Variation dieses Skalierungsfaktors wird ein Wert für f bestimmt, bei welchem die Differenz der beiden 568 nm-Signale minimal ist. Zur Isolierung der Indikatorsignale bei 457 nm und bei 490 nm werden dann die transienten Absorptionsänderungen der Referenzmessung ebenfalls vor der Differenzbildung mit diesem Skalierungsfaktor f multipliziert.

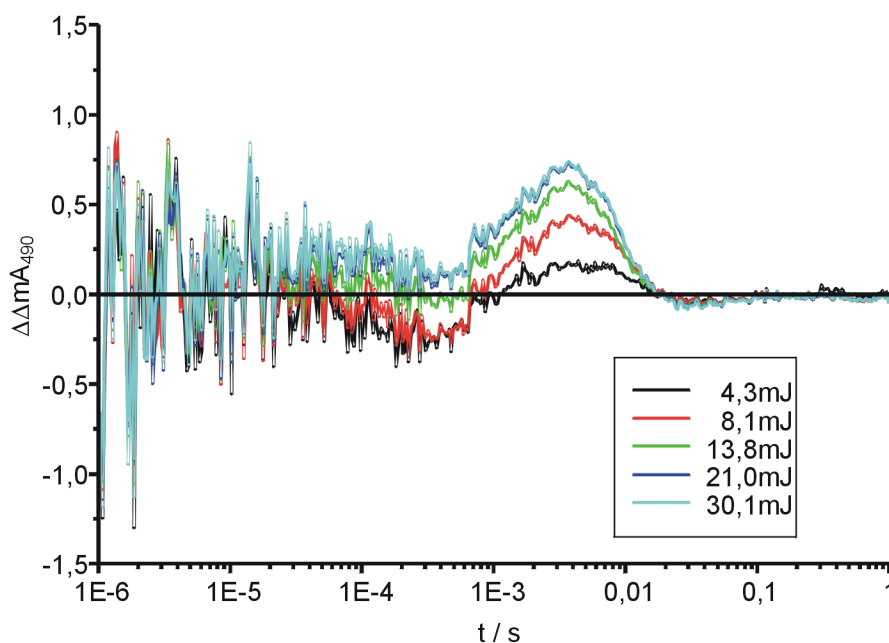


Abbildung 21: Differenz der skalierten transienten Absorptionsänderungen bei 490 nm zwischen einer Anregung mit 1,25 mJ und größeren Anregungsintensität.

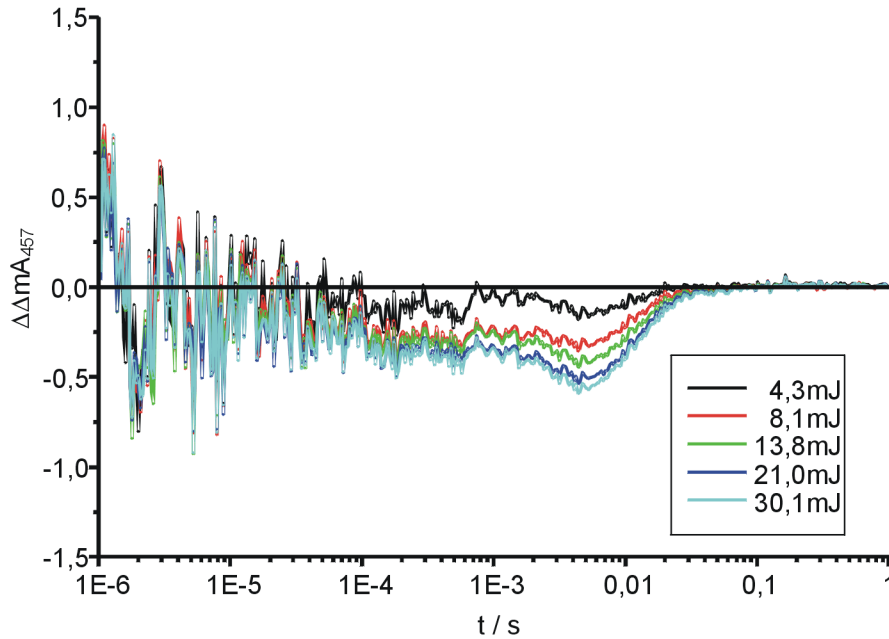


Abbildung 22: Differenz der skalierten transienten Absorptionsänderungen bei 457 nm zwischen einer Anregung mit 1,25 mJ und größeren Anregungsintensität.

In den Abbildungen 21 und 22 sind die Differenzen der transienten Absorptionsänderungen bei 457 nm und bei 490 nm nach der Skalierung aufgetragen. Gewonnen wurden diese Differenzspektren, indem zunächst die 568 nm–Absorptionssignale (Abbildung 23) der höheren Anregungsintensitäten auf das Signal bei einer Anregungsintensität von 1,5 mJ skalierte wurden. Die bei dieser Wellenlänge ermittelten Skalierungsfaktoren wurden dann in gleicher Weise bei der Differenzbildung der transienten Absorptionssignale bei 490 nm und 457 nm eingesetzt.

Wie aus den beiden Abbildungen 21 und 22 ersichtlich, ergeben sich systematische Abweichungen von der Nulllinie in einem Zeitfenster von 10^{-4} s bis $3 \cdot 10^{-2}$ s. In den anderen Zeitbereichen besteht die Differenz aus einem statistischen Rauschen. Aber auch die systematischen Abweichungen besitzen nur eine Amplitude von maximal 0,8 mOD. In Anbetracht der großen Unterschiede in den Amplituden der zur Differenzbildung herangezogenen Spektren sind diese Differenzen der aufeinander skalierten Spektren vernachlässigbar klein. Bei der Differenzbildung zur Messung der Protonentranslokation sind die Differenzen der Anregungsintensität sehr viel kleiner als in den hier gezeigten Daten. Insgesamt ergibt sich daher, daß diese Schwankungen im Photozyklus sehr gut durch eine Skalierung der Messungen mit Hilfe der transienten Absorptionsänderungen bei 568 nm kompensiert werden können.

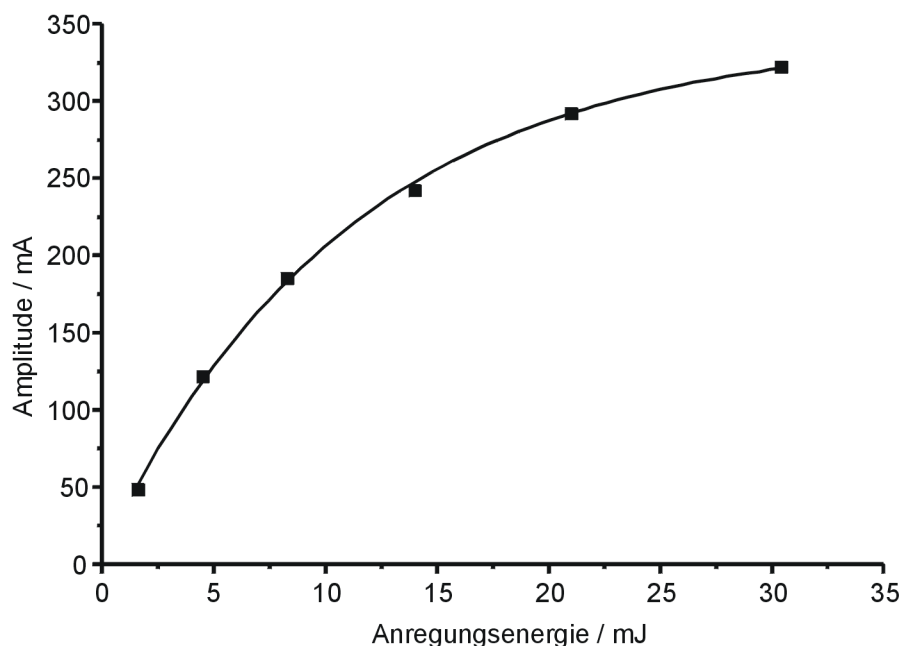


Abbildung 23: Abhängigkeit der Photozyklusamplitude bei 568 nm von der Anregungsintensität und Anpassung der Werte mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung ($[BR]$: 17,5 μ M; 150 mM KCl; pH 6,9; 20°C).

Bei der Skalierung der transienten Absorptionsänderungen zur Bildung der Differenzspektren kann die gemessene Anregungsintensität nicht herangezogen werden. Aus technischen Gründen ist es nicht möglich, simultan den pH-Wert und die gemessene Anregungsintensität aufzuzeichnen. Der pH-Wert stellt aber eine wichtige Größe dar, die zwischen den Messungen immer wieder kontrolliert und nachgestellt werden muß. Zugunsten der pH-Wertmessung wird deshalb auf die Aufzeichnung der Anregungsintensität verzichtet. Zum anderen befindet sich die Absorption des Chromophors Retinal bei den zur Durchführung benutzten Anregungsintensitäten bereits im Sättigungsbereich, so daß aufgrund der großen Anregungsenergie das Lambert-Beer'sche Gesetz für die Anregung der Probe nicht mehr gilt. Der Anteil der angeregten Bacteriorhodopsin-Moleküle und damit die Amplitude des Photozyklus steht nicht mehr in einem linearen Zusammenhang mit der Intensität des eingestrahlteten Anregungslichtes. Vielmehr besteht ein in Abbildung 23 dargestellter Zusammenhang zwischen Anregungsenergie und Photozyklusamplitude, welcher sich mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung anpassen läßt.

6.5.2 Einfluß mobiler Puffer auf die Differenzbildung

Bei der Messung der Protonentranslokation ins wäßrige Medium mit Pyranin wird die Zusammensetzung der Probe zwischen den beiden zur Differenzbildung herangezogenen Messungen nur minimal variiert, weil Pyranin nur in Konzentrationen von 10 – 50 μM eingesetzt wird. Pyranin geht außerdem keine spezifischen Wechselwirkungen mit dem Bacteriorhodopsin ein. Eine Beeinflussung des Photozyklus tritt daher durch den Zusatz dieses Indikators nicht auf. Da Pyranin bei 568 nm keine Absorption aufweist, können die transienten Absorptionsänderungen bei dieser Wellenlänge sehr gut zur Normierung und Validierung der Messung herangezogen werden. Weil die Amplitude des Photozyklus bei 457 nm, dem Absorptionsmaximum des Pyranins, sehr klein ist, wirken sich Differenzen im Photozyklus ohnehin nur wenig auf das Indikatorsignal aus (vgl. Abbildung 19).

Bei der Bestimmung des Indikatorsignals von kovalent an das Bacteriorhodopsin gebundenem Fluorescein wird in der Regel Imidazol in Konzentrationen von 5 – 10 mM zugesetzt. Vom Imidazol sind zwar keine spezifischen Wechselwirkungen mit dem Bacteriorhodopsin bekannt, wie aber aus Abbildung 24 für die transienten Absorptionsänderungen bei 490 nm zu erkennen ist, beeinflußt die Zugabe von Imidazol den Photozyklus von rekonstituierten Proteoliposomen. Bei der Purpurmembran ist ein solcher Einfluß mobiler Puffer auf die Amplitude des Photozyklus nicht zu beobachten (*Heberle, 1991*). Die hier dargestellten Ergebnisse wurden an Proteoliposomen ermittelt, deren Lipidphase aus einem Gemisch von 5 % Phosphatidsäure (EPA) und 95 % Phosphatidylcholin (EPC) besteht und in die pro Liposom 600 Bacteriorhodopsin-Moleküle (400 Lipid pro BR) und 50 ATP-Synthasen eingebaut wurden. Dies ist eine typische Zusammensetzung der Liposomen für die Untersuchung der Protonentranslokation vom Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase. Die Daten zeigen, daß sich die Amplitude des Photozyklussignals bei 490 nm, wo das Fluoresceinsignal gemessen wird, bei Zugabe von Imidazol in einer Konzentration von 10 mM um 3 mOD verringert, was etwa 8 % der Amplitude des Photozyklussignals bei dieser Wellenlänge entspricht. Für kovalent an Bacteriorhodopsin gebundenes Fluorescein in Proteoliposomen kann eine Amplitude des Indikatorsignals erwartet werden, die in etwa in der gleichen Größenordnung liegt. Für Proteoliposomen mit rekonstituierten ATP-Synthase ist die Amplitude des erwarteten Indikatorsignals noch kleiner. Ohne eine Kompensation des Einflusses von Imidazol auf den Photozyklus ist daher eine Isolierung des Fluoresceinsignals nicht möglich. Der Fehler, mit dem diese Differenzspektren behaftet wäre, läge in der gleichen Größenordnung wie das Indikatorsignal oder überstiege dieses sogar.

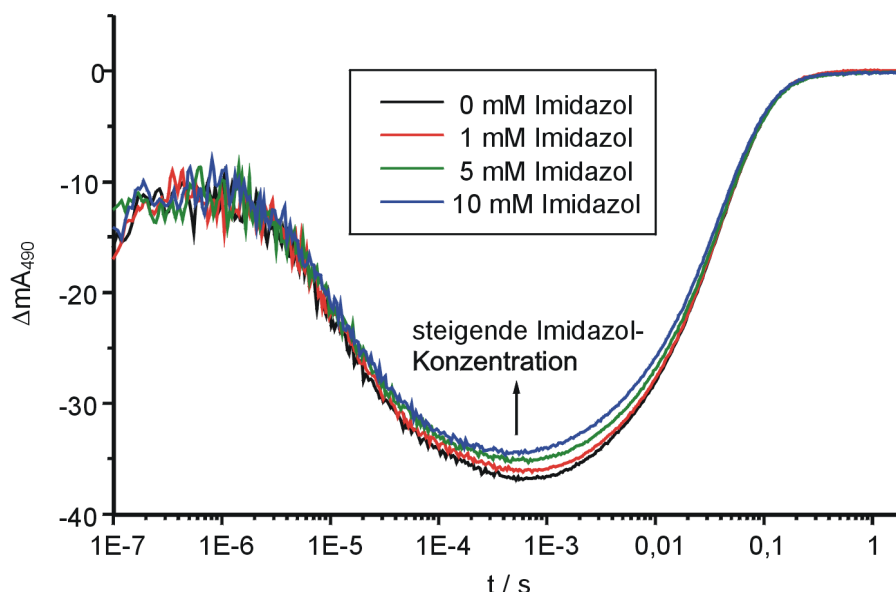


Abbildung 24: Transiente Absorptionsänderungen bei 490 nm von rekonstituierten, unmarkierten Proteoliposomen bei unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen. (Lipid: EPA / EPC, 600 BR pro Liposom, 50 ATP-Synthasen pro Liposom, $T = 20^\circ\text{C}$, 150 mM KCl, pH 6,93, 0 – 10 mM Imidazol)

Eine genauere Analyse der transienten Absorptionsänderungen bei 490 nm in Abhängigkeit von der Imidazolkonzentration zeigt, daß es sich bei den Differenzen in erster Linie um Änderungen der Amplitude handelt und die Kinetik nur wenig beeinflusst wird. Weiterhin zeigt sich, daß sich die transienten Absorptionsänderungen bei 490 nm nicht im gleichen Verhältnis ändern wie die bei 568 nm. Auch die Absorptionsänderungen bei 412 nm weichen nicht im gleichen Verhältnis von denen bei 490 nm ab. Das Fluoresceinsignal läßt sich also nicht wie das Pyraninsignal durch oben dargestellte Verwendung eines Skalierungsfaktors (Abschnitt 6.5.1) bestimmen. Statt dessen wird ein guter Wert für einen Skalierungsfaktor erhalten, wenn man den Skalierungsfaktor für 568 nm halbiert oder wenn man die transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm im Zeitbereich $< 10^{-4}\text{s}$ aufeinander normiert und den daraus erhaltenen Skalierungsfaktor bei der Differenzbildung zur Isolierung des Fluoresceinsignals verwendet. Eine nach dieser Methode berechnete Differenz der transienten Absorptionsänderungen bei 490 nm aus den in Abbildung 24 dargestellten Daten ist in Abbildung 25 aufgetragen.

Es ist zu erkennen, daß sich die systematischen Abweichungen von der Nulllinie über einen Zeitbereich von 10^{-5} s bis 10^{-2} s erstrecken und eine maximale Amplitude von 1 mOD be-

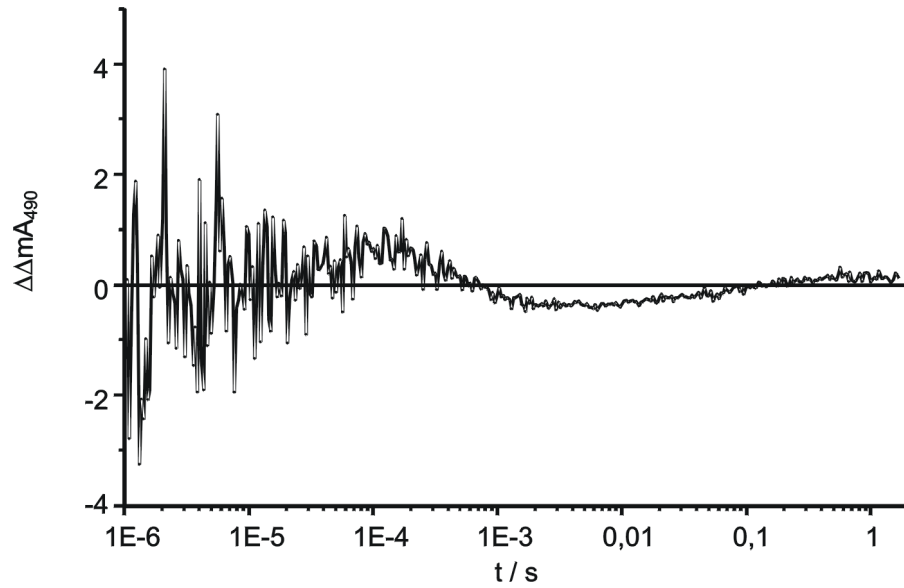


Abbildung 25: Skalierte Differenz der transienten Absorptionsänderungen bei 490 nm aus Abbildung 24 von rekonstituierten, nicht mit Fluorescein markierten Proteoliposomen ohne Imidazol und mit 10 mM Imidazol. (Skalierungsfaktor: 1,07)

sitzen. Damit sind Fluoresceinsignale, die nach dieser Methode gewonnen werden, immer noch stark fehlerbehaftet.

6.6 Photozyklus und Protonentranslokation von nativer Purpurmembran

Im Gegensatz zu den ebenfalls untersuchten Vesikeln (Abschnitt 6.10, Seite 132 ff.) handelt es sich bei der Purpurmembran um ein offenes System: Die in Abbildung 26 schematisch dargestellte Purpurmembran besteht aus planaren Membranscheiben, die eine Dicke von 5 nm und eine laterale Ausdehnung von bis zu 1 μm aufweisen. Das Bacteriorhodopsin befindet sich in der Purpurmembran in einem dicht gepackten zweidimensionalen Gitter. Die extrazelluläre und die zytoplasmatische Seite der Purpurmembran befinden sich somit im gleichen Medium.

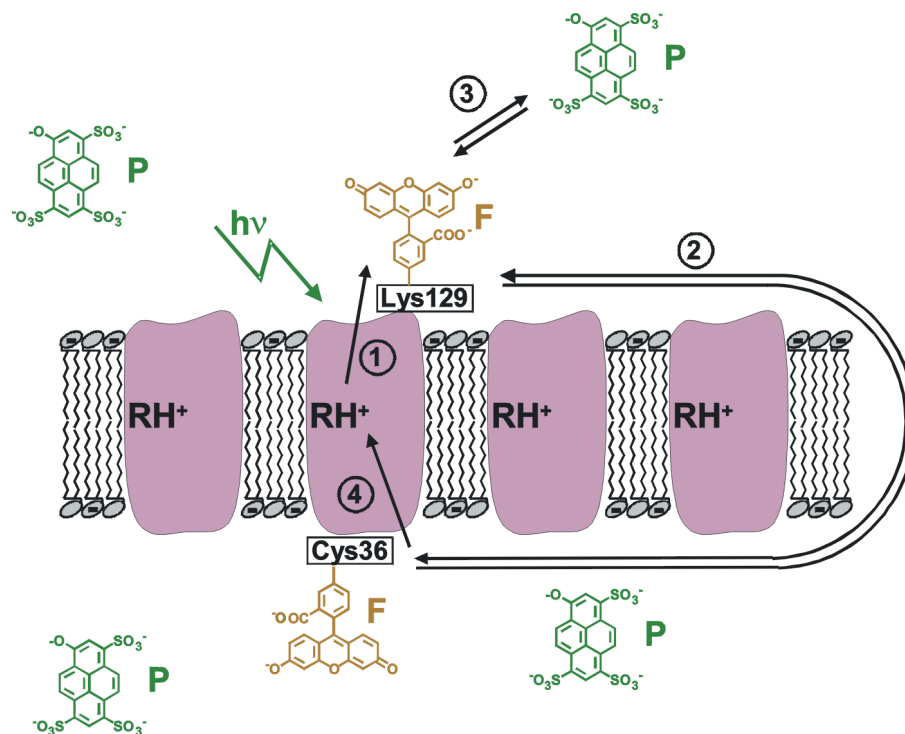


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Purpurmembran der Bacteriorhodopsin-Mutante D36C mit kovalent an die Membran gebundenem Fluorescein und mit Pyranin in der wässrigen Phase. Die Pfeile (1 bis 4) geben die stattfindenden Transferprozesse der Protonen wieder. (F: Fluorescein, P: Pyranin, RH⁺: protonierte Schiff'sche Base)

Protonen, die nach der Lichtanregung auf der extrazellulären Seite der Membran freigesetzt werden (①), können zur zytoplasmatischen Seite der Membran diffundieren, um von der dortigen Öffnung des Protonenkanals wieder aufgenommen zu werden (④). Für diese

Wanderung der Protonen stehen grundsätzlich zwei Wege zur Verfügung: Die Diffusion direkt entlang der Oberfläche der Purpurmembran (②) oder ein Austausch der Protonen mit der wässrigen Phase (③) und Diffusion der Protonen durch das wässrige Medium. Da sich beim Wildtyp der Purpurmembran auf der zytoplasmatischen Seite keine Aminosäure befindet, die sich selektiv mit einem pH-Indikator markieren läßt, ist die Diffusion der Protonen von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite der Membran beim Wildtyp des Bacteriorhodopsins nicht direkt beobachtbar.

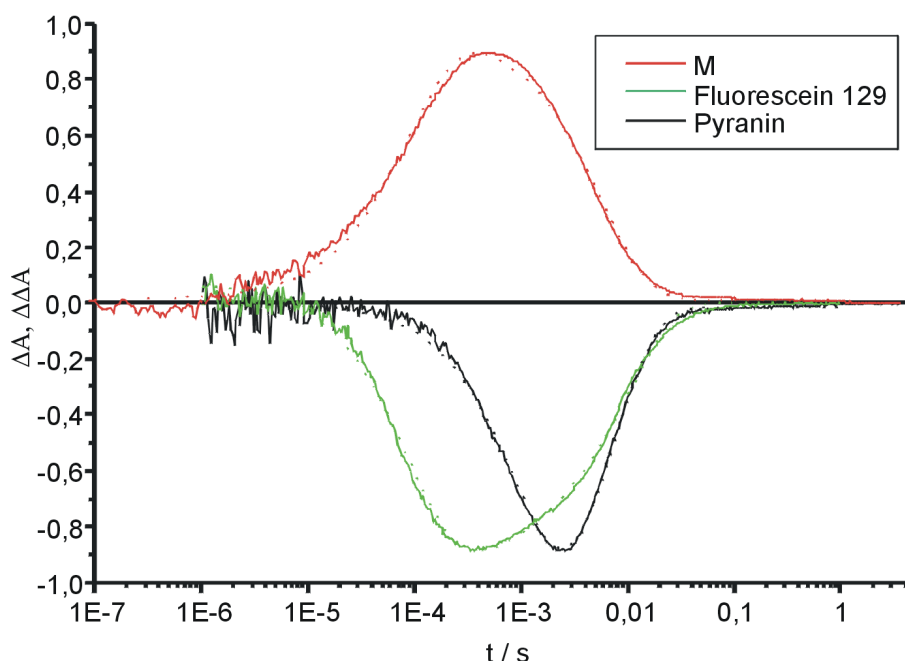


Abbildung 27: Transiente Absorptionsänderungen des Wildtyps der Purpurmembran bei 412 nm (M-Intermediat, rote Linie), von Pyranin in der wässrigen Phase (schwarze Linie) und von Fluorescein gebundenen an die extrazelluläre Oberfläche des Bacteriorhodopsins (grüne Linie) (150 mM KCl, pH 7,1, 20°C). Die Signale sind auf einen Betrag der angepaßten Amplituden von 1 normiert. Die gepunkteten Kurven geben die Anpassungen der transienten Absorptionsänderungen wieder. Für das M-Intermediat und das Pyraninsignal sind die Anpassungen mit zwei Exponentialtermen dargestellt, für das Fluoresceinsignal die Anpassung mit drei Exponentialtermen. Die Zeitkonstanten und relativen Amplituden, die aus den Anpassungen erhalten wurden sind in Tabelle 3 aufgeführt.

In Abbildung 27 sind die transienten Absorptionsänderungen des M-Intermediats bei 412 nm, von Pyranin in der wässrigen Phase bei 457 nm und von Fluorescein gebundenen

an die extrazelluläre Seite der Membran bei 490 nm dargestellt. Die Kurven für das M-Intermediat und das Pyraninsignal wurden aus einer Probe gewonnen, während das Fluoresceinsignal aus einer anderen Messung unter vergleichbaren Bedingungen stammt.

M-Kinetik						
$\tau_{M1} / \mu\text{s}$	$\tau_{M2} / \mu\text{s}$	$\tau_{M3} / \mu\text{s}$	τ_{M4} / ms	τ_{M5} / ms	τ_{Aufbau}	τ_{Zerfall}
$A_{M1} / \%$	$A_{M2} / \%$	$A_{M3} / \%$	$A_{M4} / \%$	$A_{M5} / \%$	$/ \mu\text{s}$	$/ \text{ms}$
1,7	57,6	170	3,7	8,8	83,1	5,0
-12,1	-38,0	-50,6	72,2	21,9	-100	100

Fluorescein			Pyranin	
$\tau_{F1} / \mu\text{s}$	$\tau_{F2} / \mu\text{s}$	τ_{F3} / ms	τ_{P1} / ms	τ_{P2} / ms
$A_{F1} / \%$	$A_{F2} / \%$	$A_{F3} / \%$	$A_{P1} / \%$	$A_{P2} / \%$
90	830	10,4	1,1	6,7
100	-10	-90	100	-100

Tabelle 3: Zeitkonstanten und relative Amplituden aus der Anpassung der Kurven in Abbildung 26 (150 mM KCl, pH 7,1, 20°C). Negative relative Amplituden entsprechen einer Zunahme der Absorption, positive Amplitude einer Abnahme der Absorption. Die beiden Zeitkonstanten τ_{Aufbau} und τ_{Zerfall} sind mittlere Zeitkonstanten, die aus einer Anpassung mit je einem Exponentialterm für den Aufbau und den Zerfall des M-Intermediats ermittelt wurden.

Das Pyraninsignal kann mit einer Summe aus zwei Exponentialtermen angepaßt werden, woraus sich Zeitkonstanten von 1,1 ms und 6,7 ms ergeben. Der erste dieser beiden Prozesse, der mit einer Abnahme der Absorption des Pyranins verbunden ist, resultiert aus einer Freisetzung von Protonen in die wäßrige Phase. Der zweite Prozeß, bei dem die Absorption des Pyranins wieder zunimmt und auf den Ausgangswert vor der Messung zurückkehrt, ist der Wiederaufnahme von Protonen durch die Purpurmembraan zuzuordnen.

Das Fluoresceinsignal läßt sich nur mit einer Summe aus drei Exponentialtermen zufriedenstellend anpassen. Dabei wird ein Exponentialterm mit einer Zeitkonstanten τ_{F1} von 90 μs für die Beschreibung des Abfalls der Absorption benötigt, während der Wiederanstieg der Absorption auf den Ausgangswert zwei Exponentialterme τ_{F2} , τ_{F3} mit Zeitkonstanten von 830 μs und 10,4 ms erfordert. Auch beim Fluorescein kann der erste Prozeß auf die Freisetzung von Protonen durch die Purpurmembraan zurückgeführt werden. Im

Vergleich zum Pyranin in der wäßrigen Phase kann die Freisetzung der Protonen mit Fluorescein direkt an der Membranoberfläche etwa um den Faktor 10 schneller detektiert werden. Aus der Korrelation der schnelleren Zeitkonstanten für den Zerfall des Fluoresceinsignals τ_{F2} (wiederansteigende Absorption) mit der Zeitkonstanten für den Aufbau des Pyranin Signals τ_{P1} kann geschlossen werden, daß es sich hier um den Übergang von Protonen von der Membranoberfläche in die wäßrige Phase handelt. Die unterschiedlichen Vorzeichen der Absorptionsänderungen von Fluorescein und Pyranin wird dadurch bewirkt, daß durch den Übergang der Protonen der pH-Wert an der Oberfläche der Membran ansteigt, während er in der wäßrigen Phase abfällt. Die zweite Zeitkonstante beim Zerfall des Fluoresceinsignals beschreibt wiederum die Wiederaufnahme der Protonen durch die Purpurmembran.

Die Kinetik des M-Intermediats ist komplexer als die Signale der beiden Indikatoren und läßt sich unter den Bedingungen der in Abbildung 27 dargestellten Messung nur mit einer Summe aus fünf Exponentialtermen zufriedenstellend anpassen. Verzichtet man aber auf eine exakte mathematische Beschreibung des Kurvenverlaufes und beschreibt die Kinetik des M-Intermediats mit einer Summe aus zwei Exponentialtermen, erhält man Zeitkonstanten von $83 \mu\text{s}$ für den Aufbau und 5 ms für den Zerfall des M-Intermediats. Der Kurvenverlauf, der sich aus dieser Anpassung ergibt, ist in Abbildung 27 gepunktet dargestellt. Aus einem Vergleich der Zeitkonstanten erkennt man, daß der Aufbau des M-Intermediats sehr gut mit dem Erscheinen der Protonen an der Membranoberfläche korreliert. Der Zerfall des M-Intermediats stimmt hingegen gut mit den jeweils letzten Zeitkonstanten für den Zerfall der Fluorescein- und Pyraninsignale überein.

Insgesamt ergibt sich somit das Bild, daß mit dem Aufbau des M-Intermediats die Protonen an der Oberfläche der Purpurmembran erscheinen, wo sie von dem dort kovalent gebundenem Indikator Fluorescein detektiert werden können. Der nächste Schritt ist die Equilibrierung der Protonen mit der wäßrigen Phase. Dieser Prozeß ist mit einer Zeitkonstanten von $830 \mu\text{s}$ (Fluorescein) bzw. $1,1 \text{ ms}$ (Pyranin) etwa um den Faktor 10 langsamer als das Erscheinen der Protonen an der Membranoberfläche. Detektiert werden kann dieser Austausch zwischen Membranoberfläche und wäßriger Phase sowohl durch einen ersten Anstieg der Absorption von Fluorescein an der Oberfläche der Membran als auch durch ein Abfallen der Absorption von Pyranin in der wäßrigen Phase. Mit Zeitkonstanten von $6,7 \text{ ms}$ (Pyranin) bzw. $10,4 \text{ ms}$ (Fluorescein) werden die Protonen dann von der zytoplasmatischen Seite der Purpurmembran aufgenommen, was sich wieder sowohl durch

membrangebundenes Fluorescein als auch durch Pyranin in der wäßrigen Phase detektieren läßt. Dieser Mechanismus der Protonentranslokation an der Purpurmembran ist in der Literatur allgemein anerkannt. Die Zeitkonstanten, die in dieser Arbeit für die verschiedenen Prozesse angegeben werden stimmen sehr gut mit den Werten aus der Literatur (*Grzesiek & Dencher, 1986; Herberle & Dencher, 1992; Verclas, 1998*) überein.

6.7 Photozyklus und Protonentranslokation von Purpurmembran der Bacteriorhodopsin–Mutante D36C

Zusätzlich zur Freisetzung der Protonen an der extrazellulären Oberfläche der Membran und zum Transfer der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium läßt sich an der Purpurmembran der Bacteriorhodopsin–Mutante D36C auch die Diffusion der Protonen von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Oberfläche der Membran untersuchen. Wie beim Wildtyp der Purpurmembran läßt sich die Membran an der extrazellulären Öffnung des Protonenkanals mit Fluoresceinsuccinimidylester und mit Fluoresceinisothiocyanat markieren, die beide unter geeigneten Bedingungen an die Aminosäure Lys129 kovalent binden (*Heberle & Dencher, 1990; Heberle & Dencher, 1992*). Zusätzlich bietet die D36C–Mutante des Bacteriorhodopsin auch die Möglichkeit, die zytoplasmatische Seite der Membran mit einem pH–Indikator zu koppeln. Bei der D36C–Mutante des Bacteriorhodopsins ist die Aminosäure Aspartat an Position 36, die sich auf der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins in der Nähe der Kanalöffnung befindet (Abbildung 3, Seite 14 und Abbildung 4, Seite 17), gegen Cystein ausgetauscht. Diese Cystein–Mutante kann auf der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins selektiv mit Fluoresceiniodacetamid markieren (*Heberle et al., 1994*). Durch diesen spezifischen Austausch einer Aminosäure an der zytoplasmatischen Öffnung des Protonenkanals und durch die verschiedenen Reaktivitäten von Lysin und Cystein ist eine spezifische Markierung der ein oder der anderen Seite der Membran möglich.

Während die Geschwindigkeiten für die Freisetzung der Protonen an der Membranoberfläche und für den sehr viel langsameren Transfer in die wäßrige Phase allgemein akzeptiert sind, gibt es große Differenzen über die Geschwindigkeit der Diffusion von Protonen entlang der Membranoberfläche: *Heberle et al. (1994)* fand bei Untersuchungen an der D36C–Mutante des Bacteriorhodopsins für diese Diffusion der Protonen entlang der Membranoberfläche einen Diffusionskoeffizienten, der kleiner ist als der für Protonen in der wäßrigen Phase. *Alexiev et al. (1995a)* fand in analogen Untersuchungen einen Diffusionskoeffizienten der dem für Protonen in der wäßrigen Phase entspricht. Zu dem Ergebnis, daß die Diffusion an einer Proteinmembran sogar schneller ist als die Diffusion von Protonen in Wasser kommen *Gabriel et al. (1994)* und *Gabriel & Teissé (1996)* durch Untersuchungen der Diffusion von Protonen entlang der Wasser–Protein–Grenzschicht. Diese Ergebnisse sind in der Literatur aber aufgrund von Konvektionen bei der Versuchsdurchführung umstritten.

Die Temperaturabhängigkeit der Kinetik der einzelnen Transferreaktionen gibt Aufschluß darüber, wie groß die Aktivierungsenergien der einzelnen Prozesse sind. Aus einem Vergleich der temperaturabhängigen Kinetik der Protonentranslokation mit der des M-Intermediats kann auf die Kopplung des Photozyklus mit der Protonentranslokation rückgeschlossen werden. Während die Aktivierungsenergien für die einzelnen Prozesse der M-Kinetik in der Literatur mit etwa 65 kJ mol^{-1} bis 75 kJ mol^{-1} angegeben werden (*Heberle et al.*, 1994; *Alexiev et al.*, 1995a; *Cao et al.*, 1995), gibt es unterschiedliche Daten über die Aktivierungsenergie der Detektion von freigesetzten Protonen auf der extrazellulären Oberfläche der Membran. *Heberle et al.* (1994) findet für diesen Prozeß eine Aktivierungsenergie von 40 kJ mol^{-1} , die mit dem von *Cao et al.* (1995) publizierten Wert von 38 kJ mol^{-1} gut übereinstimmt. *Alexiev et al.* (1995a) findet hingegen bei Temperaturen unterhalb 22°C eine Aktivierungsenergie von 46 kJ mol^{-1} und oberhalb 22°C einen Wert von 31 kJ mol^{-1} . *Heberle et al.* (1994) kommt zu dem Resultat, daß die Protonierung von Fluorescein auf der zytoplasmatischen Seite der Membran bei 20°C um den Faktor 3,5 langsamer verläuft als die Protonierung von Fluorescein auf der extrazellulären Seite. Aufgrund der größeren Aktivierungsenergie der Protonierung des Fluoresceins auf der zytoplasmatischen Seite im Vergleich zur Protonierung von Fluorescein auf der extrazellulären Seite wird der Unterschied in der Kinetik mit zunehmender Temperatur kleiner. Bei 40°C verlaufen dann beide Prozesse mit der gleichen Geschwindigkeit. Zu dem Ergebnis, daß Fluorescein auf der extrazellulären und der zytoplasmatischen Seite der Membran mit etwa gleicher Geschwindigkeit protoniert werden kommen *Alexiev et al.* (1995a) schon bei einer Temperatur von 22°C .

Um den Mechanismus der Protonenwanderung aufzuklären, wurden Messungen an drei Präparationen der Purpurmembra durchgeföhrt, bei denen sich jeweils ein pH-Indikator an verschiedenen Stellen des Systems befindet: Je ein Fluorescein an der zytoplasmatischen und der extrazellulären Öffnung des Protonenkanals und Pyranin in der wäßrigen Phase.

Zur Detektion der Protonentranslokation wurden die transienten Absorptionsspektren bei den Wellenlängen 412 nm, 457 nm, 490 nm und 568 nm im Temperaturbereich von 0°C bis 60°C aufgenommen. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der pK-Werte der sauren und basischen Reste der Purpurmembra und des Indikators ist der pH-Wert der gesamten Probe temperaturabhängig. Dieser wurde daher jeweils nach dem Temperieren der Probe direkt vor der Messung der transienten Absorptionsspektren auf einen Wert von pH 6,96 eingestellt. Die Temperaturabhängigkeit der pH-Elektrode wurde dabei durch

entsprechende Einstellungen am pH-Meter kompensiert. Anschließend wurde den mit Fluorescein markierten Proben Imidazol zugefügt und der unmarkierten Probe Pyranin, so daß eine Konzentration von 10 mM Imidazol bzw. 25 μ M Pyranin erreicht wurde. Für die Betrachtung der Kinetik des M-Intermediats wurden jeweils die Proben ohne Zusatz von Imidazol bzw. ohne Zusatz von Pyranin herangezogen.

6.7.1 Einfluß der kovalenten Bindung von Fluorescein auf den Photozyklus

Um ein aussagekräftiges Bild über die Protonentranslokation in der nativen Purpurmembra-
bran zu gewinnen, sollte weder der Austausch der Aminosäure Aspartat an Position 36 gegen Cystein, noch die kovalente Bindung von pH-Indikatoren eine Auswirkung auf die Funktion des Bacteriorhodopsins zu haben.

Daß der Austausch von Aminosäuren an der Oberfläche des Bacteriorhodopsins Einfluß auf Photozyklus und Protonentranslokation haben kann, konnte von *Riesle et al. (1996)* und von *Govinjee et al. (1997)* gezeigt werden. Auch chemische Modifikationen, insbesondere geladener Seitenketten des Proteins, wirken sich auf die Kinetik des Photozyklus aus (*Renthal, 1995; Schmid, 1996*).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Mutanten des Bacteriorhodopsins haben gezeigt, daß der Austausch von Aminosäuren an der Oberfläche der Purpurmembra-
bran eine Auswirkung auf die Kinetik des Photozyklus haben kann. So wurden von *Riesle et al. (1996)* die sauren und damit negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat in den Positionen D36, D38, D102, D104 und E161 gegen die neutrale Aminosäure Cystein bzw. gegen die basische und damit positiv geladene Aminosäure Arginin ausgetauscht. Diese modifizierten Aminosäurereste befinden sich in den Schleifenregionen auf der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins und nehmen damit wahrscheinlich keine strukturellen Aufgaben wahr. Im Gegensatz zum Austausch der Aminosäure an den Positionen 38, 102 und 104 wurde bei der Mutante D36C nur ein geringer Einfluß auf die Kinetik des M-Intermediats gefunden. Die mittlere Zerfallszeit für das M-Intermediat vergrößerte sich von 6 ms im Wildtyp der Purpurmembra-
bran auf 8,8 ms in der Mutante D36C. Dieser Befund ist nach *Checover et al. (1997)* dadurch zu erklären, daß die Aminosäure D38 zusammen mit zwei weiteren Resten einen Cluster bilden, der für die Aufnahme von Protonen aus dem leicht alkalischen Zytoplasma verantwortlich ist. Der Aminosäure D36

kommt dabei die Aufgabe zu, das Proton von diesem Sammelkomplex zur Öffnung des Kanals weiterzuleiten.

Daß sich auch der Austausch der Aminosäure Lys 129 auf den Photozyklus auswirkt, konnte von *Govinjee et al. (1997)* gezeigt werden. Untersuchungen beim Austausch dieses Lysins gegen Histidin zeigten, daß sich die pK-Werte der Aminosäuren D85 und E204 im extrazellulären Halbkanal änderten und sich die Abfolge von Protonenfreisetzung und -wiederaufnahme umkehrte.

Bei der untersuchten D36C-Mutante des Bacteriorhodopsins ist die Aminosäure Aspartat in Position 36 auf der zytoplasmatischen Seite des Proteins gegen die Aminosäure Cystein ausgetauscht. Die negative Ladung, die das Aspartat beim Wildtyp des Bacteriorhodopsins trägt, ist somit in der Mutante neutralisiert. Bei der Markierung dieser Position mit Fluorescein befindet sich an dieser Stelle je nach Protonierungszustand des Fluoresceins eine bis zwei negative Ladungen, was den Verhältnissen im Wildtyp wieder näher kommt. Bei der Markierung des Bacteriorhodopsins am Lysin 129 ist die Änderung der Ladung noch gravierender. Die positive Ladung des Lysins wird unter physiologischen Bedingungen gegen eine bis zwei negative Ladungen des Fluoresceins ausgetauscht.

In Abbildung 28 sind die transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm der drei vermessenen Proben der D36C-Mutante und des Wildtyps der Purpurmembran bei einer Temperatur von 20 °C dargestellt. In Tabelle 4 sind die aus einer Anpassung erhaltenen kinetischen Daten der D36C-Mutante denen des Wildtyps gegenübergestellt. Aus den dargestellten Werten ist ein Einfluß des Austausches der Aminosäure Asp 36 gegen Cystein und der Markierung insbesondere auf die zweite Hälfte des Photozyklus, den Zerfall des M-Intermediats, zu erkennen.

Ein Vergleich der kinetischen Daten für den Wildtyp der Purpurmembran mit denen der D36C-Mutante (Tabelle 4) zeigt, daß die gesamte Kinetik des M-Intermediats in der D36C-Mutante geringfügig schneller ist als im Wildtyp. Die Anpassung der Kinetik mit je einem Exponentialterm für den Aufbau und den Zerfall des M-Intermediats macht deutlich, daß die Unterschiede in der Kinetik beim Zerfall des M-Intermediats größer sind als bei dessen Aufbau. Geht man davon aus, daß die Aminosäure Aspartat 36 im Wildtyp des Bacteriorhodopsins funktionell an der Wiederaufnahme von Protonen aus der wäßrigen Phase beteiligt ist (*Riesle et al., 1996; Checover et al., 1997*), dann widerspricht der schnellere Zerfall des M-Intermediats in der D36C-Mutante den Erwartungen.

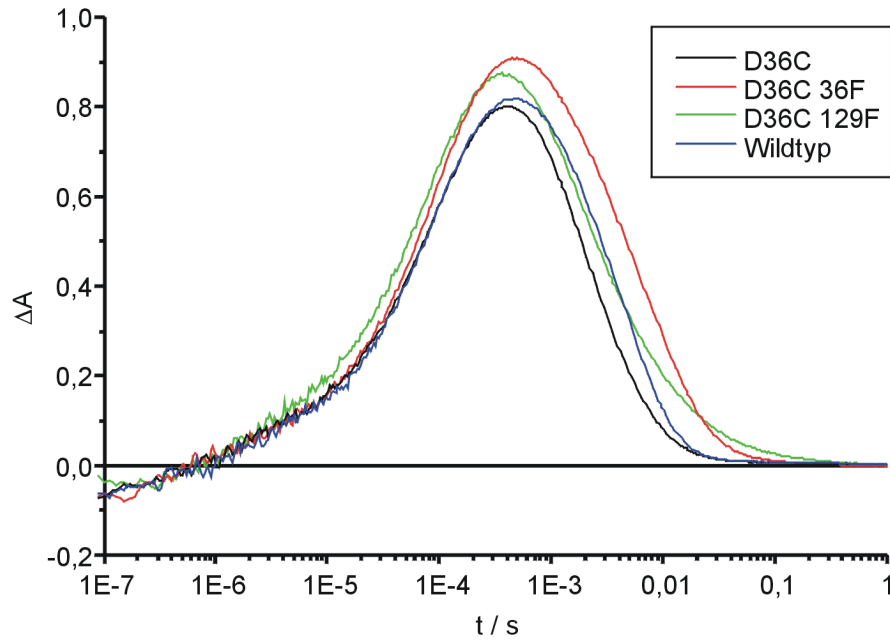


Abbildung 28: Vergleich der transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm der an Positionen 36 und 129 markierten D36C-Mutante der Purpurmembran mit der unmarkierten Probe und mit dem Wildtyp der Purpurmembran. ($T = 20^\circ\text{C}$, 150 mM KCl, pH 6,96)

	$\tau_{M1} / \mu\text{s}$ $A_{M1} / \%$	$\tau_{M2} / \mu\text{s}$ $A_{M2} / \%$	$\tau_{M3} / \mu\text{s}$ $A_{M3} / \%$	τ_{M4} / ms $A_{M4} / \%$	τ_{M5} / ms $A_{M5} / \%$	$\tau_{\text{Aufbau}} / \mu\text{s}$	$\tau_{\text{Zerfall}} / \text{ms}$
D36C	1,4 -13	43 -27	162 -66	2,0 73	7,7 27	80	3,4
Wildtyp	1,7 -12	58 -38	170 -51	3,7 72	8,8 22	83	5,0

Tabelle 4: Zeitkonstanten der Kinetik des M-Intermediats aus Abbildung 28 von unmarkierter D36C-Mutante der Purpurmembran (schwarze Linie) und dem Wildtyp der Purpurmembran (blaue Linie) ($T = 20^\circ\text{C}$, 150 mM KCl, pH 6,96)

Eine negative Ladung in der Nähe der Kanalöffnung auf der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins sollte die Attraktion auf Protonen erhöhen und damit deren Wiederaufnahme beschleunigen. Zu diesem Ergebnis kommen auch *Riesle et al. (1996)* in ihrem Vergleich der D36C-Mutante mit dem Wildtyp der Purpurmembran. Da in dem Artikel von *Riesle et al. (1996)* die Kinetik des M-Intermediats dieser Mutante und des Wild-

typs der Purpurmembran mit sechs Exponentialtermen angepaßt wurde, lassen sich die Ergebnisse nicht unmittelbar miteinander vergleichen. Bei der in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführten Anpassung des Zerfalls des M-Intermediats mit einem Exponentialterm wurde eine Zeitkonstante von 6 ms für den Wildtyp ermittelt, was sich mit dem in Tabelle 4 aufgeführten Wert deckt. Für die D36C-Mutante ermittelten *Riesle et al. (1996)* eine Zeitkonstante von 8,8 ms, die der Erwartung eines langsameren Zerfalls entspricht, aber dem in dieser Arbeit ermittelten Wert entgegensteht. In weiteren Arbeiten (*Heberle et al., 1994; Verclas, 1998; Grzesiek & Dencher, 1986; Cao et al., 1995*) publizierte Zeitkonstanten für die Kinetik des M-Intermediats des Wildtyps der Purpurmembran stimmen ebenfalls mit den hier dargestellten Werten überein. Da die bei dieser Probe gefundenen Zeitkonstanten für den Übergang der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium ebenfalls kleiner sind als die für den Wildtyp der Purpurmembran ermittelten Werte (Abschnitt 6.6) kann davon ausgegangen werden, daß die verwendete Probe sich neben der Mutation noch in einer weiteren, unbekannten Eigenschaft vom Wildtyp unterscheidet.

Eine detaillierte Betrachtung des Einflusses der Markierung auf die Kinetik des Photozyklus ist mit Hilfe der in Abbildung 29 dargestellten Temperaturabhängigkeit der Kinetik des M-Aufbaus und der in Abbildung 30 dargestellten Temperaturabhängigkeit der Kinetik des M-Zerfalls möglich. Die einzelnen Meßwerte sind in den Tabellen 14, 15 und 16 auf den Seiten 175 *f.* aufgeführt.

In Übereinstimmung mit der Literatur (*Riese et al., 1996; Govinjee et al., 1997*) wirkt sich die Modifikation der Proteinoberfläche durch die Markierung mit Fluorescein auf beiden Seiten der Membran auf die zweite Hälfte des Photozyklus, den Zerfall des M-Intermediats, stärker aus als auf dessen Aufbau. Wie aus Abbildung 29 hervorgeht ist die Kinetik des Aufbaus des M-Intermediats von der Markierung an Position C36 im Rahmen der Fehlerstreuung unbeeinflußt. Eine kovalente Bindung von Fluorescein an K129 bewirkt dagegen bei der Geschwindigkeitskonstanten k_{M2} (schwarze Punkte) eine Beschleunigung um den Faktor zwei. Auch bei der Geschwindigkeitskonstanten k_{M3} (schwarze Dreiecke) ist eine minimale Beschleunigung zu erkennen. Die Aktivierungsenergien zeigen keine Beeinflussung durch die Markierung, was aus dem parallelen Verlauf der Ausgleichsgeraden hervorgeht.

Der Zerfall des M-Intermediats (Abbildung 30, Seite 101) ist von der kovalenten Bindung der pH-Indikatoren stärker beeinflußt als der Aufbau. Hier wirkt sich der Einfluß von

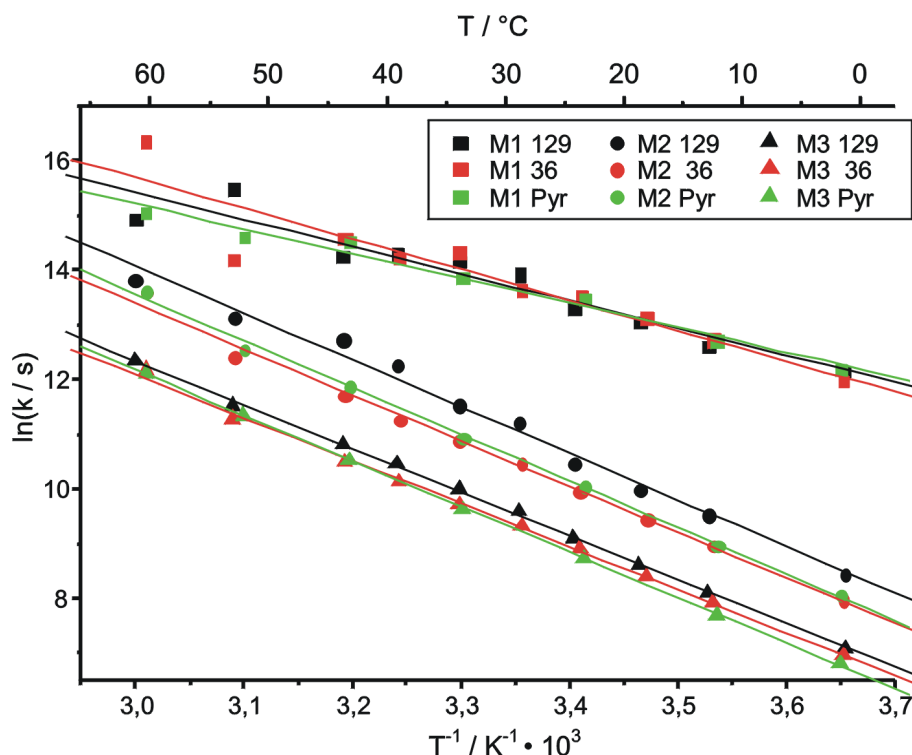


Abbildung 29: Arrhenius-Diagramm für die drei Ratenkonstanten $k_{M1} - k_{M3}$ des Aufbaus des M-Intermediats in der Purpurmembran der Mutante D36C. Die Werte für die an K129 mit Fluorescein markierte Purpurmembran sind schwarz aufgetragen, die Werte der an C36 markierten Purpurmembran rot und die Werte für die unmarkierte Purpurmembran sind grün dargestellt. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von $0^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ bei einer Salzkonzentration von 150 mM und einem pH-Wert von 6,96 durchgeführt.

Fluorescein sowohl an Position 36 als auch an Position 129 aus. Beide Zerfallsprozesse werden durch die Bindung der Indikatoren im gesamten Temperaturbereich verlangsamt. Für den schnelleren der beiden Prozesse ($M4$) bedeutet die Bindung des Indikators an der Position C36 (Faktor 1,2) einen größeren Einfluß als an der Position K129 (Faktor 1,7). Für den langsameren Zerfallsprozeß ($M5$) hingegen ist der Einfluß der Markierung an der Position C36 kleiner als an der Position K129. Insgesamt wird dieser letzte Zerfallsprozeß von der kovalenten Bindung des Indikators am stärksten beeinflusst. Im Vergleich zu der unmarkierten D36C-Purpurmembran ist die Geschwindigkeit dieses letzten Zerfallsprozesses bei der Position C36 markierten Purpurmembran um den Faktor 1,5 verlangsamt und bei der an Position K129 markierten Membran um den Faktor drei. Während die

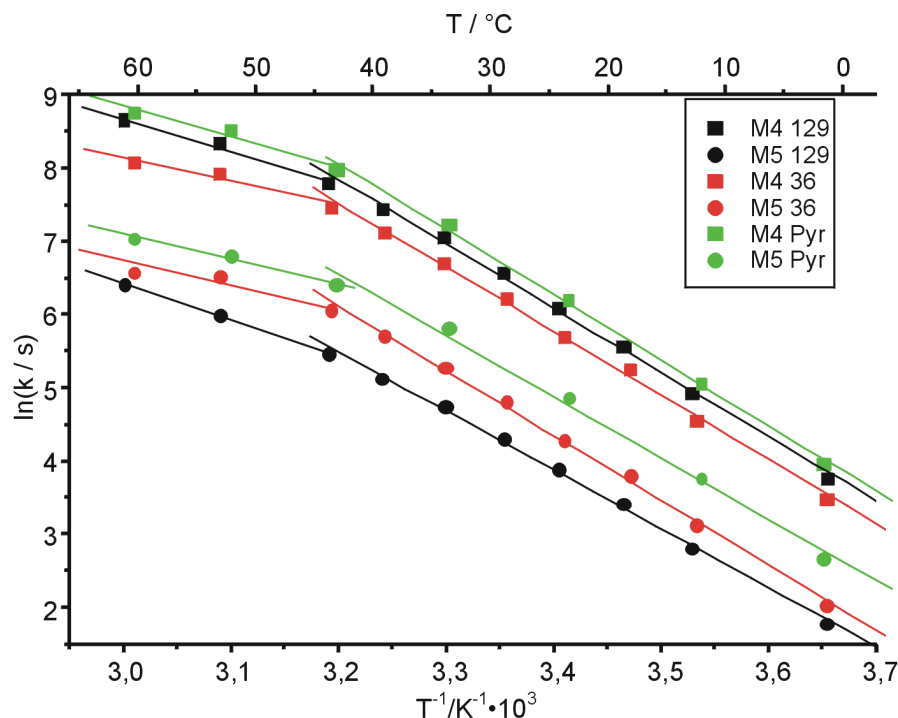


Abbildung 30: Arrhenius-Diagramm für die zwei Ratenkonstanten k_{M4} und k_{M5} des Zerfalls des M-Intermediats in der Purpurmembra n der Mutante D36C. Entsprechend Abbildung 29 sind die Werte für die beiden markierten Purpurmembra nen und die unmarkierte Purpurmembra n in unterschiedlichen Farben dargestellt (schwarz: Fluorescein an K129; rot: Fluorescein an C36; grün: unmarkiert). Temperaturbereich: 0°C – 60°C, 150 mM KCl, pH 6,96.

Abweichung der Kinetik bei der kovalenten Bindung von Fluorescein an der Position C36 mit der Aufgabe dieser Aminosäure als Bindeglied zwischen der "Protonenantenne" und der Kanalöffnung zu erklären ist, müssen für die Beeinflussung durch die Bindung an die Aminosäure K129 andere Ursachen gesucht werden.

Oberhalb einer Temperatur von 45°C steigen die Geschwindigkeitskonstanten der Zerfallsprozesse des M-Intermediats nicht mehr so stark mit der Temperatur an wie unterhalb dieser Temperatur. Dieser plötzliche Abfall der Aktivierungsenergien wird für den Aufbau des M-Intermediats nicht beobachtet und kann ohne weitere Untersuchungen nicht gedeutet werden. Denkbar ist aber, daß bei 45°C eine Aggregation der Purpurmembra n einsetzt, welche die Wiederaufnahme der Protonen behindert und damit den Zerfall des M-Intermediats verlangsamt. Oberhalb von 70°C kann diese Aggregation deutlich als Ausflockung der Purpurmembra n beobachtet werden.

Werden die auf Seite 98 in Abbildung 28 dargestellten transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm zur besseren Vergleichbarkeit mit je einem Exponentialterm für den Aufbau und den Zerfall angepaßt, ergeben sich die in Tabelle 5 dargestellten Werte für die mittleren Zeitkonstanten der Kinetik des M-Intermediats bei 20 °C. Die Werte machen deutlich, daß der Zerfall des M-Intermediats in den markierten Proben bis zu 250 % gegenüber der unmarkierten Probe verlangsamt ist. Die Unterschiede der beim Aufbau des M-Intermediats liegen dagegen nur bei etwa 20 %.

	$\tau_{\text{Aufbau}} / \mu\text{s}$	$\tau_{\text{Zerfall}} / \text{ms}$
unmarkiert	61	3,3
Fluorescein an C36	70	8,2
Fluorescein an K129	47	5,6

Tabelle 5: Vergleich der mittleren Zeitkonstanten für den Aufbau und Zerfall des M-Intermediats zwischen der unmarkierten D36C-Purpurmembra n und der an Position 36 bzw. 129 mit Fluorescein markierten Mutante der Membran bei 20 °C (150 mM KCl, pH 6,96).

6.7.2 Korrelation zwischen Photozyklus und Protonentranslokation

In der Literatur wird häufig der Zusammenhang zwischen der Kinetik des M-Intermediats und der Freisetzung der Protonen an der extrazellulären Membranoberfläche bzw. der Wiederaufnahme der Protonen von der zytoplasmatischen Membranseite diskutiert (Heberle & Dencher, 1992; Heberle et al., 1993; Alexiev et al., 1994b). Dieser Zusammenhang ist deshalb naheliegend, weil bei der Entstehung dieses Intermediats ein Proton die Schiff'sche Base am Retinal verläßt und beim Zerfall des M-Intermediats die Schiff'sche Base reprotoniert wird. Diese beiden Prozesse stellen somit die Startpunkte für die Freisetzung von Protonen zur extrazellulären Seite und die Wiederaufnahme von Protonen von der zytoplasmatischen Seite der Membran dar.

Heberle (1991) kommt aufgrund von Untersuchungen an der nativen Purpurmembra n mit Fluorescein an K129 zu dem Schluß, daß das Proton mit dem Übergang vom L- zum M-Intermediat an der Membranoberfläche erscheint. Auch Alexiev et al. (1994b) beschreiben einen Zusammenhang der Detektion des Protons durch Fluorescein an der extrazellulären

Oberfläche mit dem $L \rightarrow M$ -Übergang. *Cao et al. (1995)* kommen hingegen aufgrund von Messungen mit membrangebundenem pH-Indikator an der nativen Purpurmembran und an einigen Mutanten zu dem Ergebnis, daß kein solcher Zusammenhang besteht. Nach ihren Messungen kann das Proton an der extrazellulären Oberfläche mit unterschiedlichen Zeiten detektiert werden. Diese Zeiten hängen von den Bedingungen der Messung ab und liegen zeitlich zwischen der Protonierung der Aminosäureseitenkette D85 ($L \rightarrow M$ -Übergang) und dem Ende des Zerfalls des M-Intermediats. Eine Änderung des Zusammenhangs zwischen Erscheinens von Photozyklusintermediaten und Protonenfreisetzung bzw. Protonenwiederaufnahme ist auch schon bei anderen Mutanten des Bacteriorhodopsins beobachtet worden (*Heberle et al., 1993; Govinjee et al., 1997*).

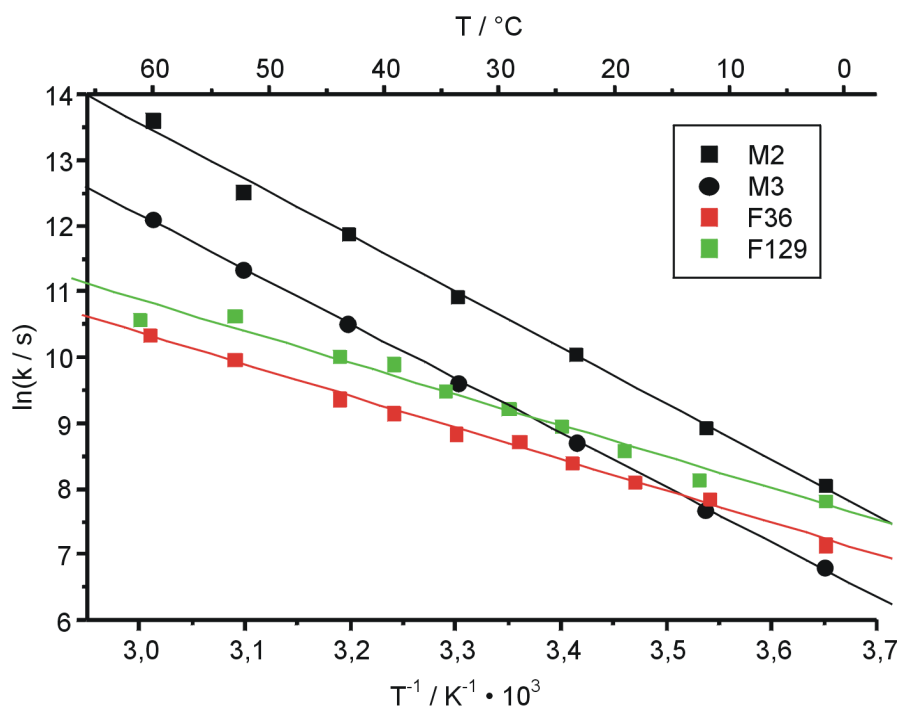


Abbildung 31: Vergleich der temperaturabhängigen Kinetik des Aufbaus des M-Intermediats mit der Kinetik der Detektion der Protonen durch an Bacteriorhodopsin gebundenes Fluorescein auf der extrazellulären und zytoplasmatischen Seite der D36C-Mutante der Purpurmembra n (150 mM KCl, pH 6,96).

In den beiden Abbildungen 31 und 32 ist ein Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Kinetik des M-Intermediats mit den Kinetiken der Protonierung und Deprotonierung von membrangebundenem Fluorescein dargestellt. Es sind jeweils nur die für den Zeitbereich relevanten Prozesse des Aufbaus bzw. des Zerfalls des M-Intermediats wiedergegeben.

Aus der Abbildung 31 geht hervor, daß bei einer Temperatur von 25°C die freigesetzten

Protonen durch Fluorescein an der Aminosäure K129 tatsächlich mit einer Geschwindigkeitskonstanten detektiert werden können, die der Geschwindigkeitskonstanten k_{M3} entspricht, welche mit dem Übergang vom L-Intermediat zum M-Intermediat korreliert. Diese Übereinstimmung trifft jedoch nur bei dieser einen Temperatur von 25 °C zu. Bei tieferen Temperaturen wird das Proton am Fluorescein schneller detektiert, als es diesem Übergang entspricht, und bei höheren Temperaturen langsamer. Bei -4 °C wäre theoretisch sogar eine Temperatur erreicht, bei der die Geschwindigkeit der Protonierung des Fluoresceins an K129 der Geschwindigkeitskonstanten k_{M2} entspricht, die dem Übergang vom K-Intermediat zum L-Intermediat wiedergibt.

Verursacht wird diese Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten durch die unterschiedlichen Aktivierungsenergien der beteiligten Prozesse (F129: $E_a = 39,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, F36: $E_a = 40,2 \text{ kJ mol}^{-1}$, M2: $E_a = 70,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, M3: $E_a = 69,1 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die Werte für die Aktivierungsenergien stehen im Einklang mit den Daten von *Heberle (1991)*, *Heberle et al. (1994)* und *Cao et al. (1995)*. Hierbei fand *Heberle (1991)*, *Heberle et al. (1994)* für die Protonierung von Fluorescein an Lys 129 mit 35 kJ mol^{-1} einen etwas kleineren Wert. Im Gegensatz zu *Alexiev et al. (1995a)* liegen die Meßwerte im gesamten Temperaturbereich auf einer Geraden und zeigen keinen Knick. *Alexiev et al. (1995a)* finden unterschiedliche Aktivierungsenergien unterhalb und oberhalb von 22 °C bei Fluorescein gebunden an G72. Nach der Freisetzung des Protons an der Schiff'schen Base des Retinals gelangt dieses durch Diffusion entlang eines Netzwerkes aus Wassermolekülen und Aminosäureseitenketten im extrazellulären Halbkanal zur Oberfläche des Proteins. Solch diffusive Prozesse haben eine geringere Aktivierungsenergie ($E_a = 18 \text{ kJ mol}^{-1}$ für Protonen in Wasser, *Yoshino et al., 1989*) als die Konformationsänderungen im Protein und Chromophor, die beim Übergang zwischen den einzelnen Photozyklus-Intermediaten auftreten. Die Größe der Aktivierungsenergie für die Protonierung von Fluorescein an der extrazellulären Öffnung des Kanals zeigt weiterhin, daß es sich bei der Diffusion des Protons im Kanal des Bacteriorhodopsins aber nicht um eine freie Diffusion handelt.

Aus den dargestellten Daten ergibt sich, daß von einer direkten Korrelation zwischen der Kinetik des M-Intermediats und der Freisetzung der Protonen an der extrazellulären Oberfläche nicht gesprochen werden kann. Die Kinetik der Protonenfreisetzung wird durch die Translokationsschritte des Protons im extrazellulären Halbkanal bestimmt und ist nicht direkt mit einem Übergang zwischen den Intermediaten des Photozyklus gekoppelt. Weiterhin ist anhand der Daten für die Protonierung von Fluorescein an C36 und K129

zu erkennen, daß der Indikator auf der extrazellulären Seite der Membran um den Faktor 1,5 schneller protoniert wird als auf der zytoplasmatischen Seite der Membran. Bei 20 °C entspricht das einem Zeitunterschied von 100 μ s (vgl.: Heberle et al., 1994: 150 μ s; Alexiev et al., 1995a: 3 μ s).

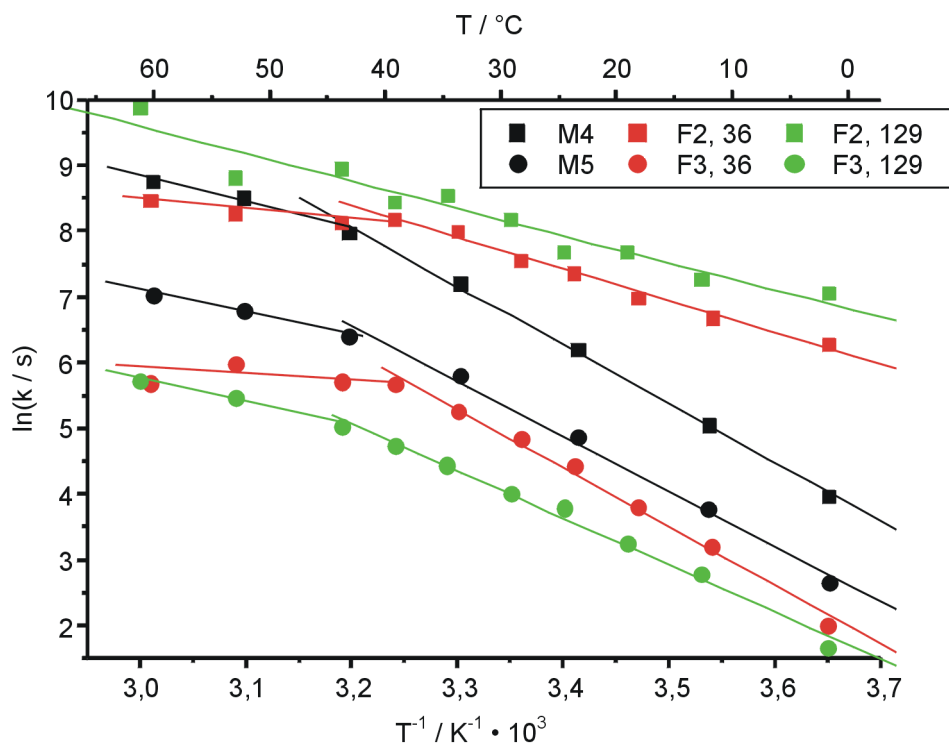


Abbildung 32: Vergleich der Kinetik des Zerfalls des *M*-Intermediats mit der Kinetik der Deprotonierung des membrangebundenen Fluoresceins auf der extrazellulären und zytoplasmatischen Seite der Purpurmembran.

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
E_a / kJ mol ⁻¹	37,5	70,9	69,1	74,4	69,8

M-Kinetik

	F _{1,129}	F _{2,129}	F _{3,129}	F _{1,36}	F _{2,36}	F _{3,36}	P ₁	P ₂
E_a / kJ mol ⁻¹	39,7	34,5	51,8	40,2	40,3	74,6	33,5	60,2

Fluorescein an K129, C36 und Pyranin

Tabelle 6: Aktivierungsenergien der Übergänge des *M*-Intermediats und der Protonentransferprozesse der D36C-Purpurmembran (150 mM KCl, pH 6,96).

In Abbildung 32 sind in einem Arrhenius-Diagramm die Ratenkonstanten für den Zerfall der Indikatorsignale (F2, 36; F3, 36; F2, 129; F3, 129) von Fluorescein auf der extrazellulären und zytoplasmatischen Seite der D36C-Purpurmembraan zusammen mit den Ratenkonstanten für den Zerfall des M-Intermediats aufgetragen. Auch hier ist wieder, wie schon in Abbildung 30, oberhalb von 40 °C eine Abweichung der Daten von der Geraden zu erkennen. Wie aus der Abbildung und den Daten für die Aktivierungsenergie in Tabelle 6 zu erkennen ist, gibt es bei der Wiederaufnahme von Protonen keine Korrelation zum schnelleren Zerfallsprozeß des M-Intermediats. Die Geschwindigkeiten des schnelleren der beiden Deprotonierungsschritte des Fluoresceins überschneiden sich zwar bei höheren Temperaturen mit den Geschwindigkeitskonstanten τ_{M4} , aber auch hier verdeutlichen die stark unterschiedlichen Aktivierungsenergien der beteiligten Prozesse (M4: $E_a = 74,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, F2, 129 : $E_a = 34,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, F2, 36: $E_a = 40,3 \text{ kJ mol}^{-1}$), daß keine Korrelation zwischen diesen beiden Prozessen besteht. Da der schnellere Deprotonierungsprozeß des Fluoresceins dem Übergang der Protonen von der Membranoberfläche in das wäßrige Medium entspricht (Abschnitt 6.6, Seite 89ff., Heberle, 1991), ist ein solcher Zusammenhang auch nicht zu erwarten.

Die Daten der Geschwindigkeitskonstanten des langsameren Prozesses des Zerfalls des M-Intermediats (τ_{M5}) zeigen eine ähnliche Aktivierungsenergie wie die letzte Phase der Deprotonierung von Fluorescein an C36. Der Wert der Aktivierungsenergie für den Deprotonierungsprozeß von Fluorescein an K129 ist mit $51,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ kleiner als der Wert für die Deprotonierung von Fluorescein an C36. Der Zerfall des M-Intermediats verläuft allerdings insgesamt etwas schneller als die letzte Phase der Deprotonierung von Fluorescein an C36 und K129. Die Daten für den Zerfall des M-Intermediats (τ_{M5}) wurden aus den Messungen der unmarkierten D36C-Purpurmembraan gewonnen. Aus Abbildung 30 auf Seite 101 ist zu erkennen, daß diese Zerfallsprozesse bei den beiden markierten D36C-Purpurmembraanen (M4, 36; M5, 36; M4, 129; M5, 129) langsamer verlaufen als bei der unmarkierten Membran. Vergleicht man die Deprotonierungskinetiken von Fluorescein auf beiden Seiten der Membran mit der in Abbildung 32 dargestellten Kinetik des Zerfalls des M-Intermediats der markierten Purpurmembraanen, so ergibt sich eine sehr gut Übereinstimmung zwischen der langsameren Komponente des M-Zerfalls mit der langsameren Phase der Deprotonierung von Fluorescein an C36 und K129.

Zusammenfassend kann aufgrund der beschriebenen Ergebnisse eine direkte Kopplung der Freisetzung der Protonen an der extrazellulären Oberfläche mit der Kinetik des Pho-

tozyklus ausgeschlossen werden. Die Übereinstimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{M3} ($L \rightarrow M$ -Übergang) mit der Geschwindigkeitskonstanten für die Protonierung des Fluoresceins an K129 bei 20 °C sind zufällig. Die Übereinstimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Deprotonierung der Fluoresceine auf beiden Seiten der Membran mit dem letzten Zerfallsschritt des M-Intermediats über einen weiten Temperaturbereich von 0 °C bis 60 °C zeigt auf der anderen Seite, daß hier die Aufnahme des Protons von der zytoplasmatischen Seite der Membran direkt mit dem Photozyklus gekoppelt ist. Weitere Indizien dafür liefern Untersuchungen von *Heberle (1991)*, in denen gezeigt wurde, daß dieser letzte Zerfallsschritt des M-Intermediats bei steigendem pH-Wert langsamer wird. Auch der Befund, daß Bacteriorhodopsin auf der zytoplasmatischen Seite der Membran einen Cluster von Carboxylatresten ausbildet (*Checover et al. 1997*), welcher die Aufgabe hat, Protonen aus dem umgebenden Medium zu binden und an die Öffnung des Kanals weiterzuleiten, zeigt, daß diese Protonenaufnahme der geschwindigkeitsbestimmende Schritt am Ende des Photozyklus sein muß.

6.7.3 Kinetik der Protonentranslokation an Purpurmembran

Die Messung der Protonentranslokation mit membrangebundenem Fluorescein auf der extrazellulären Seite der Purpurmembran an der Positionen K129, auf der zytoplasmatischen Seite an der Position C36 und mit Pyranin in der wäßrigen Phase geben Aufschluß über die Wanderungen der Protonen nach deren Freisetzung durch das Bacteriorhodopsin. Die zeitliche Differenz der Detektionszeiten für das Proton auf den gegenüberliegenden Seiten der Membran ermöglicht die Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit für Protonen an der Membranoberfläche. Diese Diffusionsgeschwindigkeit ist insbesondere für die Verfügbarkeit der Protonen durch andere Proteine wie die ATP-Synthase entscheidend.

Über die Geschwindigkeit der Diffusion der Protonen zur zytoplasmatischen Seite der Membran gibt es widersprüchliche Angaben der Literatur. *Heberle et al. (1994)* konnten die Protonen bei 20 °C auf der extrazellulären Membranseite mit einer Zeitkonstanten von 78 μs und auf der zytoplasmatischen Membranseite mit einer Zeitkonstanten von 228 μs detektieren und fanden damit eine Differenz von 150 μs . *Alexiev et al. (1995a)* ermittelten bei 22 °C für den gleichen Prozeß Zeiten von 71 μs bzw. 74 μs und erreichen damit eine Differenz von nur 3 μs für die Diffusion der Protonen von der einen Membranseite zur gegenüberliegenden.

Aus diesen Zeitdifferenzen ergeben sich unter Annahme eines durchschnittlichen Radius der Purpurmembran von 250 nm aus der Formel $\Delta r^2 = 4Dt$ für eine zweidimensionale Diffusion Diffusionskonstanten von $3,0 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ (Alexiev *et al.*, 1995a) bzw. $1,0 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ (Heberle *et al.*, 1994). Bei dieser Rechnung handelt es sich nur um eine Näherung, da die Größenverteilung der Purpurmembran und die Verteilung der Diffusionsdistanzen nicht in Betracht gezogen werden. Ein Vergleich mit der Diffusionskonstanten von Protonen in Wasser ($9,3 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) zeigt aber, daß sich aus den Untersuchungen von Alexiev *et al.* (1995a) eine Diffusionskonstante ergibt, die der von Protonen in Wasser nahekommt, während Heberle *et al.* (1994) zu dem Schluß kommt, daß die Diffusion von Protonen entlang einer Membran wesentlich langsamer verläuft als in der wäßrigen Phase. Die langsamere Diffusion an der Membran ist plausibel, da während der Diffusion ständig Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen an der Membran ablaufen, welche die Diffusionsgeschwindigkeit verringern sollten. Untersuchung der Diffusion von Protonen zwischen zwei Reservoirs entlang einer Proteinmembran von Gabriel & Teissié (1996) und Gabriel *et al.* (1994) führen zu dem Ergebnis, daß die Diffusion von Protonen entlang einer solchen Membran sogar schneller ist als die Diffusion durch die wäßrige Phase. Diese Ergebnisse sind in der Literatur aber umstritten, weil durch den Versuchsaufbau Konvektionen in den Lösungen nicht ausgeschlossen werden können.

	F129	F36	Pyranin
$\tau_1 / \mu\text{s}$	126	221	298
τ_2 / ms	0,46	0,63	6,9
τ_3 / ms	22,5	11,9	

Tabelle 7: Ermittelte Zeitkonstanten aus den in Abbildung 33 dargestellten transienten Absorptionsänderungen für Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wäßrigen Phase für die D36C-Mutante der Purpurmembran (150 mM KCl, 20°C, pH 6,96).

In der Abbildung 33 sind exemplarisch im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen transienten Absorptionsänderungen der Indikatoren Fluorescein an Position K129 bzw. C36 sowie von Pyranin in der wäßrigen Phase bei einer Temperatur von 20°C in 150 mM KCl-Lösung bei neutralem pH-Wert dargestellt. Die aus diesen transienten Absorptionsänderungen ermittelten Zeitkonstanten sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Die für den Transfer der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium ge-

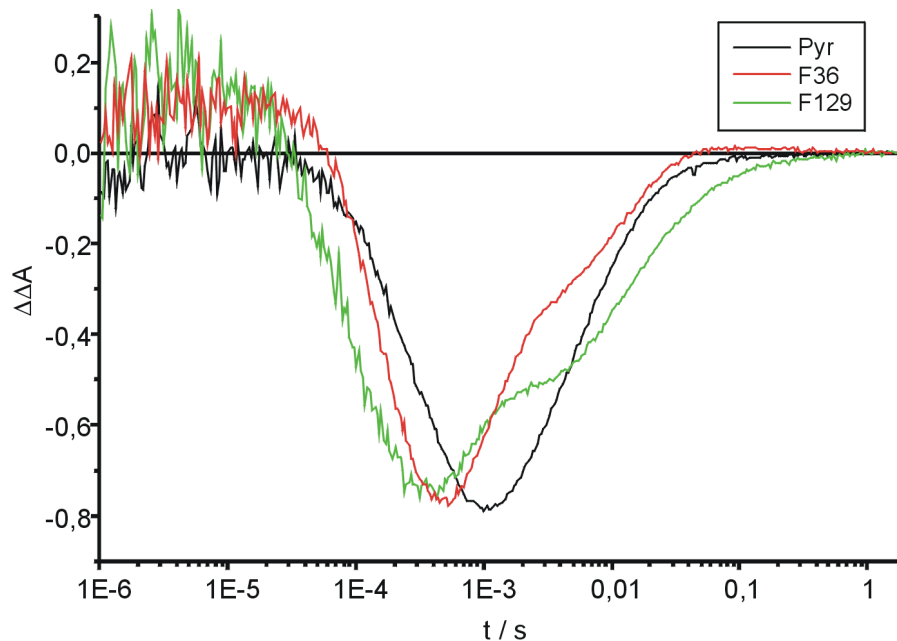


Abbildung 33: Vergleich der Protonierungskinetik von membrangebundenem Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wässrigen Phase (150 mM KCl, 20°C, pH 6,96). Die Amplituden der Signale sind auf einen Werte von $\Delta\Delta A = 1$ normiert.

gemessene Zeit kann als ungewöhnlich betrachtet werden. Der in dieser Arbeit festgestellten Zeitkonstanten von 298 μs für die Protonierung von Pyranin bei 20°C stehen Literaturwerte gegenüber, die sich im Bereich von 800 μs (eigene Messungen am Wildtyp der Purpurmembran) bis 1,3 ms (Heberle et al., 1994; Verclas, 1998; Grzesiek & Dencher, 1986; Cao et al., 1995) bewegen. Die für diesen Prozeß gemessene Geschwindigkeit stellt damit neben dem Zerfall des M-Intermediats (Abschnitt 6.7.1, Seite 96f.) einen weiteren Unterschied zu den Eigenschaften des Wildtyps der Purpurmembran dar.

Für die Protonierung der Fluoresceine auf beiden Seiten der Membran wurden Zeiten von 126 μs bzw. 221 μs gefunden, die damit einer Differenz von 95 μs entsprechen. Aus dieser Differenz ergibt sich eine Diffusionskonstante von $1,6 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Diese Diffusionskonstante ist zwar etwas größer als der von Heberle et al. (1994) gefundene Wert, liegt aber in der gleichen Größenordnung und unterstützt damit die These, daß die Diffusion von Protonen an der Membranoberfläche langsamer verläuft als in der wässrigen Phase.

Die in Abschnitt 6.6 auf Seite 89f. dargestellte Korrelation zwischen der Deprotonierung von Fluorescein auf der extrazellulären Seite und der Protonierung von Pyranin in der

wäßrigen Phase wird von den Daten aus Abbildung 33 nur bedingt unterstützt. Die Zeitkonstanten für beide Prozesse liegen zwar in der gleichen Größenordnung, aber wie der Werte von $298\ \mu\text{s}$ für die Protonierung von Pyranin, so ist auch der Wert von $460\ \mu\text{s}$ für die erste Deprotonierungsphase von Fluorescein an Position 129 ungewöhnlich klein. Wenn es sich bei diesen Prozeß um den Übergang von Protonen von der Membranoberfläche in die wäßrige Phase handelt, dann sollte auch der erste Deprotonierungsschritt von Fluorescein auf der zytoplasmatischen Seite mit diesen beiden Zeitkonstanten übereinstimmen. Diese Zeitkonstante liegt aber mit $630\ \mu\text{s}$ schon relativ weit von den Zeitkonstanten für den ersten Deprotonierungsschritt von Fluorescein auf der extrazellulären Seite und für die Protonierung von Pyranin in der wäßrigen Phase entfernt. Die Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten dieser drei Prozesse (Abbildung 34) legt aber zumindest nahe, daß zwischen der ersten Phase der Deprotonierung von Fluorescein auf der extrazellulären Seite und der Protonierung von Pyranin ein Zusammenhang besteht.

Die aus der Abbildung 33 ersichtlichen Unterschiede in den Zeitkonstanten beim jeweils letzten Schritt der Deprotonierung der drei Indikatoren sind zunächst unverständlich, wenn man bedenkt, daß die Diffusion der Protonen schneller ist als die im Zeitfenster von etwa 10 ms stattfindende Wiederaufnahme der Protonen durch die Purpurmembran. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Geschwindigkeiten für Diffusion und Wiederaufnahme der Protonen wäre zu erwarten, daß die Indikatoren in einem Gleichgewicht miteinander stehen und deshalb mit der gleichen Geschwindigkeit deprotoniert werden (vgl. Abschnitt 6.6). Die Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten der Deprotonierung der Indikatoren, die für Pyranin 6,86 ms, für die langsamere Komponente des Fluoresceins an K129 22,5 ms und für die langsamere Komponente des Fluoresceins an C36 11,9 ms betragen, werden dann verständlich, wenn man in Betracht zieht, daß sich auch der Zerfall des M-Intermediats dieser drei unterschiedlich markierten Purpurmembran unterscheidet (Abbildung 28, Seite 98). Mit Zeitkonstanten für die langsamere Komponente des Zerfalls des M-Intermediats (τ_{M5}) von 7,7 ms für die unmarkierte Purpurmembran, 20,6 ms für die an K129 und 13,8 ms für die an C36 mit Fluorescein markierte Purpurmembran korrelieren diese Werte sehr gut mit den für die Deprotonierung der Indikatoren gefundenen Zeitkonstanten. Unklar ist dabei jedoch, was Ursache und welches die Wirkung ist: Ob also der verlangsamte Photozyklus eine verzögerte Aufnahme der Protonen aus der wäßrigen Phase bewirkt, oder ob die langsamere Aufnahme der Protonen aus der wäßrigen Phase den Photozyklus verzögert.

Die dargestellten transienten Absorptionsänderungen legen einen Mechanismus nahe, bei dem die Protonen zunächst an der extrazellulären Oberfläche der Membran erscheinen. Die Diffusion entlang der Membranoberfläche ist gegenüber der Diffusion in das umgebende wäßrige Medium bevorzugt. So können Protonen an der zytoplasmatischen Seite der Membran schneller detektiert werden als im wäßrigen Medium, obwohl die Protonen hierfür einen Weg zurücklegen müssen, der in etwa einer Strecke von $0,25\mu\text{m}$ entspricht (Alexiev *et al.*, 1995a) und sich das Pyranin in einem Abstand von wenigen nm von der Membran befindet.

Die Abbildungen 34 und 35 zeigen die Temperaturabhängigkeit der Protonierungskinetiken bzw. Deprotonierungskinetiken der drei eingesetzten Indikatoren. Bei der Beschreibung der Temperaturabhängigkeit dieser Kinetiken gibt es große Differenzen in der Literatur. Während Heberle *et al.* (1994) und Cao *et al.* (1995) für die Protonierung von Fluorescein an Lys 129 auf der extrazellulären Seite der Membran eine Aktivierungsenergie von 35 kJ mol^{-1} bzw. 38 kJ mol^{-1} finden, errechnet Heberle *et al.* (1994) aus seinen Daten für die Protonierung von Fluorescein an Cys 36, auf der zytoplasmatischen Seite der Membran eine Aktivierungsenergie von 88 kJ mol^{-1} . Das hat zur Folge, daß bei 20°C eine Differenz von $150\text{ }\mu\text{s}$ für die Zeitkonstanten der Protonierung von Fluorescein an Cys 36 und Lys 129 herrscht, während die Indikatoren auf den verschiedenen Seiten der Membran bei 40°C zeitgleich protoniert werden. Ein Arrhenius-Diagramm für die Protonierung von Fluorescein an Position 72 (ebenfalls auf der extrazellulären Seite des Bacteriorhodopsins) von Alexiev *et al.* (1995a) weist hingegen ein Knick bei 22°C auf. Aus den Daten von Alexiev *et al.* (1995a) für die Protonierung von Fluorescein an Position 72 ergibt sich unterhalb 22°C einer Aktivierungsenergie von 47 kJ mol^{-1} und oberhalb von 22°C eine Aktivierungsenergie von 30 kJ mol^{-1} .

Die einzelnen Meßwerte in den Abbildungen 34 und 35 sind in der Tabelle 17 (Seite 177) aufgeführt. Die schon für eine Temperatur von 20°C erläuterte Abfolge der einzelnen Prozesse bleibt über den gesamten dargestellten Temperaturbereich von 0°C bis 60°C erhalten. Die Ausgleichsgeraden für die Protonierungskinetik von Fluorescein an Position C36 und K129 und für Pyranin in der wäßrigen Phase verlaufen parallel und zeigen keinen Knick mit unterschiedlichen Aktivierungsenergien unterhalb und oberhalb von 22°C wie bei Alexiev *et al.* (1995a). Dieses zeigt, daß alle drei Prozesse bis zu einer Temperatur von 40°C eine gleiche Aktivierungsenergie von etwa 40 kJ mol^{-1} besitzen. Während die Aktivierungsenergie für die Protonierung von Fluorescein auf der extrazellulären Seite des Bacteriorhodopsins mit den Daten von Heberle *et al.* (1994) und Cao *et al.* (1995)

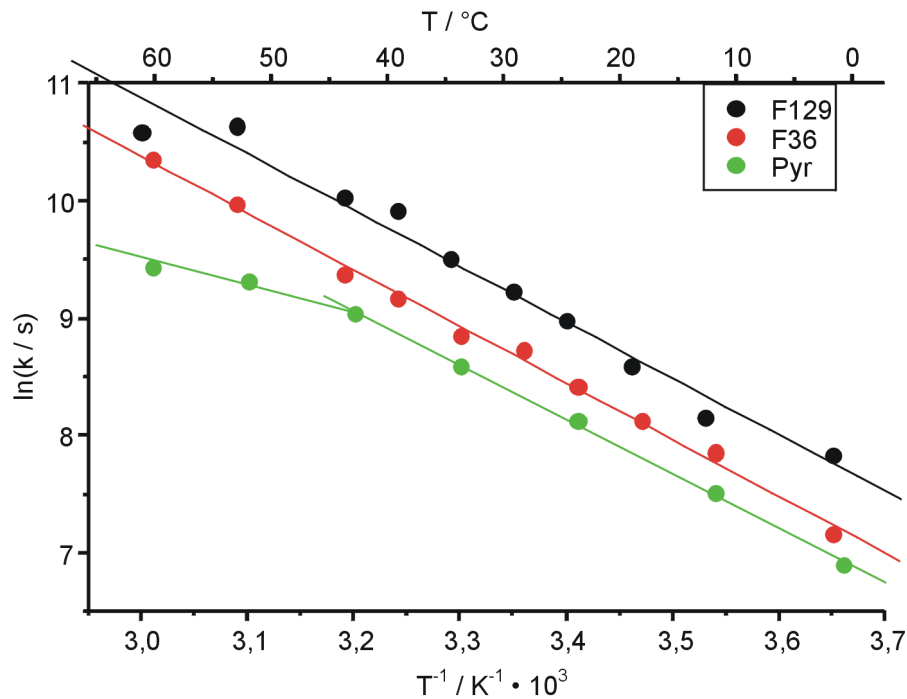


Abbildung 34: Temperaturabhängigkeit der Protonierung von membrangebundenem Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wässrigen Phase (150 mM KCl, 20°C, pH 6,96).

übereinstimmen, ergibt sich ein Widerspruch zu der von *Heberle et al. (1994)* ermittelten Aktivierungsenergie für die Protonierung von Fluorescein an Position 36 auf der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins. Wenn die Protonierung von Fluorescein auf dieser Seite der Membran aus einer Diffusion der Protonen entlang der Membran resultiert, dann sollte die Zeitdifferenz zwischen der Detektion der Protonen an der Kanalöffnung und auf der gegenüberliegenden Seite der Membran mit steigender Temperatur kleiner werden. Dies trifft für die Absolutwerte in Abbildung 34 zu. Mit einem solchen diffusiven Mechanismus läßt sich jedoch nicht erklären, warum die Protonen bei 40°C auf beiden Seiten der Membran gleichzeitig detektiert werden sollten, wie bei *Heberle et al. (1994)* dargelegt.

Die in Abbildung 35 dargestellte Temperaturabhängigkeit der Deprotonierung aller drei Indikatoren und der Protonierung von Pyranin zeigt, daß die Protonierung von Pyranin in der wässrigen Phase zumindest mit der schnellen Phase der Deprotonierung von Fluorescein an der extrazellulären Seite der Membran eng gekoppelt ist, was schon in Abschnitt 6.6 dargelegt wurde. Eine Kopplung der Protonierung von Pyranin mit der

schnellen Phase der Deprotonierung von Fluorescein auf der zytoplasmatischen Seite ist aus den Daten nicht zu erkennen. Unterhalb von 40 °C besitzen beide Prozesse zwar eine ähnlich große Aktivierungsenergie, die Geschwindigkeiten dieser beiden Prozesse sind jedoch unterschiedlich. Auch das Abknicken der Geraden für die Werte von Fluorescein an Position 36 oberhalb von 40 °C spiegelt sich in der Protonierung von Pyranin nicht wieder.

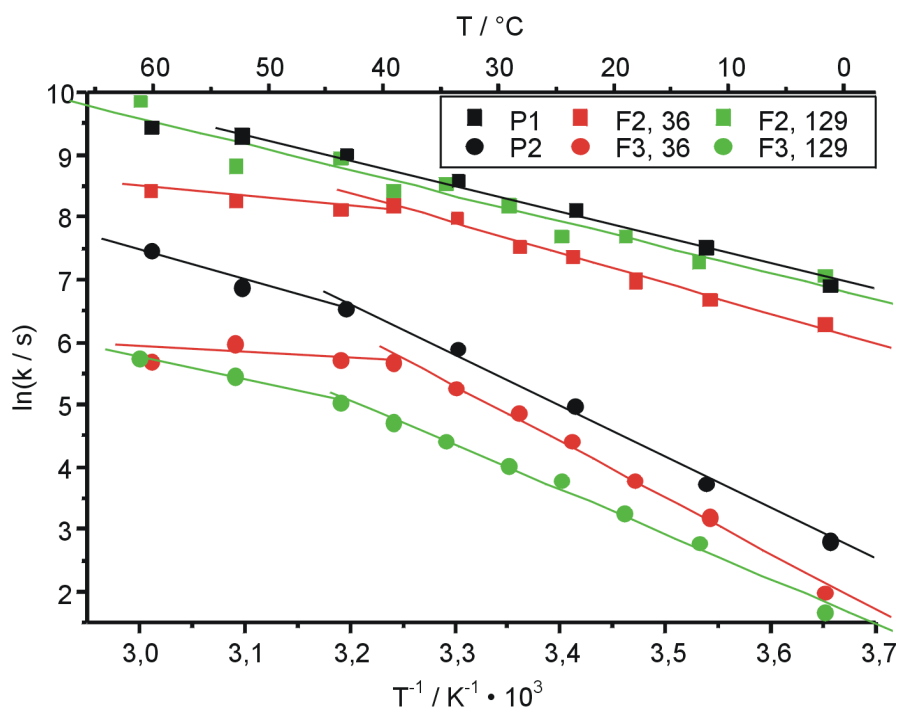


Abbildung 35: Temperaturabhängigkeit der Deprotonierung von membran-gebundenem Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wässrigen Phase (150 mM KCl, 20 °C, pH 6,96).

Aufgrund des Einflusses der Kopplung von Indikatoren an das Bacteriorhodopsin auf den Photozyklus sind die temperaturabhängigen Daten des letzten Schrittes der Deprotonierung der Indikatoren wenig aussagekräftig bezüglich der Protonentranslokation. Sie unterstützen jedoch das Resultat, daß die Wiederaufnahme von Protonen auf der zytoplasmatischen Seite der Membran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im letzten Teil des Photozyklus bei der Relaxation zum Grundzustandes ist. Der Verlauf der Punkte in der Auftragung in Abbildung 35 korreliert gut mit den Daten für die letzte Phase des Zerfalls des M-Intermediats (τ_{M5}) in Abbildung 30 auf Seite 101. Auch die Abweichung der Meßwerte von der Linearität bei Temperaturen oberhalb von 40 °C findet sich in den Daten der Kinetik des M-Intermediats wieder.

6.8 Einfluß des Carboxyterminus auf den Photozyklus und die Protonentranslokation

An der zytoplasmatischen Seite von Helix G befindet sich das carboxyterminale Ende des Bacteriorhodopsins. Die sich an die Helixstruktur anschließenden Aminosäuren Serin 226 bis Serin 248 bilden dabei eine ungeordnete Kette, die auf der zytoplasmatischen Seite aus der Membran herausragt. Aufgrund der fehlenden Struktur dieses Bereiches entzieht sich das carboxyterminale Ende einer Strukturanalyse mit Hilfe von Diffraktionsmethoden. Die Abfolge der Aminosäuren ist jedoch aus Sequenzanalysen bekannt (*Dunn et al., 1981*). In diesem Bereich befinden sich vier negativ geladene Aminosäuren (*Khorana, 1979; Birge, 1990*), die damit einen Beitrag zur Oberflächenladungsdichte auf der zytoplasmatischen Seite der Membran liefern. Experimentell wurde von *Alexiev et al. (1994a)* ermittelt, daß sich die Oberflächenladung des Bacteriorhodopsins von 2,5 auf 1,7 negative Ladungen pro Bacteriorhodopsin reduziert, wenn man den carboxyterminalen Rest entfernt. In der Literatur ist der Einfluß des Carboxyterminus bzw. der Entfernung des Carboxyterminus auf Photozyklus und Protonentranslokation umstritten (*Ort & Parson, 1979; Govindjee et al., 1982; Grzesiek & Dencher, 1986; Arrio et al., 1986*). Messungen von *Gutman et al. (persönliche Mitteilung)* legen die Vermutung nahe, daß einzelne Aminosäuren dieses Restes an der „Protonenantenne“, einem Cluster hoher Protonenaffinität, beteiligt sind und deshalb funktionelle Bedeutung für die Reprotonierung des Proteins besitzen. Um die Beteiligung des carboxyterminalen Restes an der Protonentranslokation zu untersuchen, wurden daher Messungen an der Purpurmembran durchgeführt, bei denen dieser Rest durch eine Abspaltung mit Papain entfernt wurde.

Papain, eine Protease aus *Papaya latex*, spaltet bevorzugt die Peptidbindungen nach den Aminosäuren Glycin, Arginin, Lysin, Glutamin und Tyrosin. Durch die Anordnung des Bacteriorhodopsins in einer dicht gepackten Membran ist der größte Teil der in Frage kommenden Bindungen vor einer Spaltung geschützt. Unter geeigneten Bedingungen läßt sich daher mit Papain selektiv und quantitativ die Peptidbindung zwischen Glycin 231 und Glutamat 232 hydrolysieren und damit der Carboxyterminus abtrennen.

Zur Kontrolle der Abspaltung des Carboxyterminus wurde das Reaktionsprodukt mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. Dabei zeigte sich, daß die in der Literatur angegebenen Reaktionsbedingungen (*Fimmel, 1989; Fimmel et al., 1989*) nicht ausreichend waren, um eine quantitative Spaltung zu erreichen. Die Reaktion wurde deshalb

mit einem Verhältnis von Papain zu Bacteriorhodopsin von 1:50 durchgeführt und die Inkubationszeit von zwei auf vier Stunden erhöht. Die Notwendigkeit dieser veränderten Reaktionsbedingungen ist möglicherweise auf eine reduzierte Aktivität des Papains in Folge von Überlagerung zurückzuführen. In der SDS-Gelelektrophorese zeigte das Bacteriorhodopsin eine Bande bei 24700 kDa, während die Bande des zur Kontrolle aufgetragenen Ausgangsproduktes bei 26500 kDa völlig verschwunden war. Die Molekularmasse des abgespaltenen Carboxyterminus ist zu klein, um bei den gewählten Bedingungen auf dem Gel nachgewiesen zu werden. In Analogie zu den Untersuchungen an der D36C-Mutante des Bacteriorhodopsins (vgl. Kapitel 6.7) wurde auch bei diesen Untersuchungen die Cystein-Mutante eingesetzt und die Messungen an drei verschiedenen Präparationen mit Pyranin in der wäßrigen Phase und Fluorescein jeweils an den Positionen K129 und C36 durchgeführt. Aufgrund der größeren Neigung der Papain-verdauten D36C-Purpurmbran zur Aggregation wurden diese Messungen nur bis zu einer Temperatur von 50 °C durchgeführt.

6.8.1 Einfluß des Carboxyterminus auf den Photozyklus

Der in Abbildung 36 dargestellte Vergleich der Kinetik des M-Intermediats zwischen der Papain-verdauten und der unverdauten Purpurmbran zeigt, daß der Carboxyterminus auf den Aufbau des M-Intermediats keine Auswirkungen hat. Der Zerfall des M-Intermediats ist hingegen bei der Papain-verdauten Purpurmbran leicht verzögert.

Ein Vergleich der Kinetik des M-Intermediats mit Daten aus der Literatur ist erschwert, da die meisten Autoren eine Anpassung der transienten Absorptionsänderungen mit sechs Exponentialtermen durchführten, während die Daten dieser Arbeit durch eine Anpassung mit fünf Exponentialtermen ausreichend gut wiedergegeben werden.

Aus der Anpassung der Kinetik des M-Intermediats mit je einer Exponentialfunktion erster Ordnung für Aufbau und Zerfall ergibt sich für den Aufbau des M-Intermediats für beide Proben eine Zeitkonstante bei 20 °C von $\tau_{\text{Aufbau}} = 70 \mu\text{s}$. Für den Zerfall des M-Intermediats ergibt sich für die unverdaute Membran eine Zeitkonstante von $\tau_{\text{Zerfall,D36C}} = 3,33 \text{ ms}$ und für die Papain-verdaute Membran eine Zerfallskonstante von $\tau_{\text{Zerfall,D36CV}} = 4,46 \text{ ms}$. Damit verläuft der Zerfall des M-Intermediats bei der Papain-verdauten D36C-Mutante der Purpurmbran zwar langsamer als bei der unverdauten D36C-Mutante,

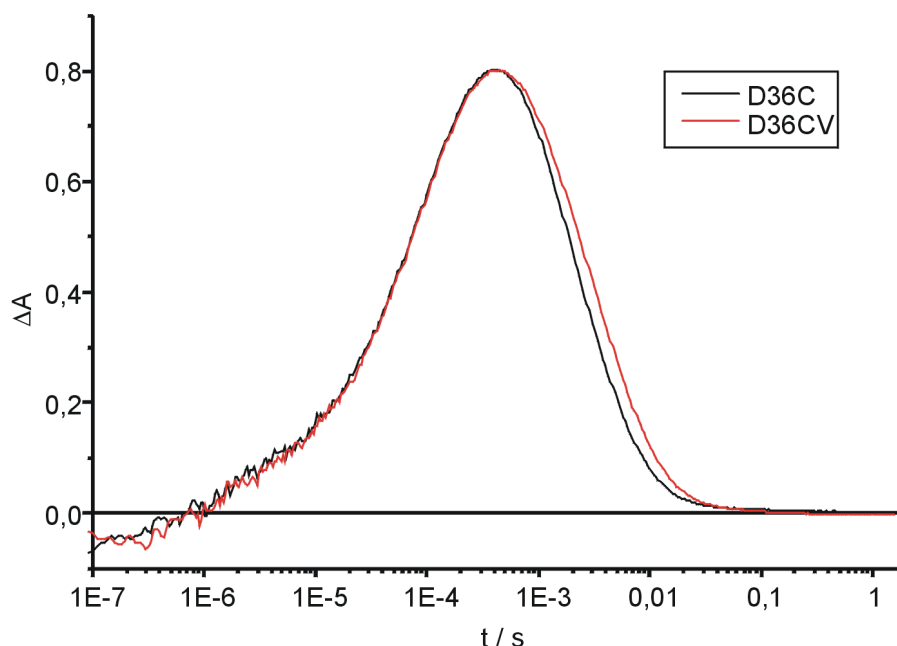


Abbildung 36: Vergleich der transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm zwischen der Papain-verdauten Purpurmembra (D36CV) und der nicht verdauten Purpurmembra (D36C) bei 20°C, 150 mM KCl, pH 6,96.

aber noch geringfügig schneller als beim Wildtyp der Purpurmembra (5,0 ms, Abbildung 27, Tabelle 3, Seite 90 f.).

Die in Abbildung 37 in einem Arrhenius-Diagramm aufgetragenen Geschwindigkeitskonstanten für den Zerfall des M-Intermediats erlauben eine detaillierte Betrachtung dieser Differenzen. Wie aus der Abbildung zu erkennen, ist der verlangsamte Zerfall des M-Intermediats auf beide Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls des M-Intermediats zurückzuführen und erstreckt sich über den Temperaturbereich von 0 °C bis 40 °C. Wie die Meßwerte für die unverdaute D36C-Purpurmembra weichen auch die Werte für die Papain-verdaute D36C-Membra bei Temperaturen oberhalb von 40 °C im Arrhenius-Diagramm von der Geraden ab. Auch hier liegt wieder die Vermutung nahe, daß diese Abweichungen im kinetischen Verhalten auf eine Aggregation der Purpurmembranen bei erhöhter Temperatur zurückzuführen ist. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung, daß die Papain-verdaute Purpurmembra bei höheren Temperaturen stärker zur Aggregation neigt als die unverdaute Purpurmembra. Das Abknicken der Geraden in den Arrhenius-Diagrammen tritt jedoch für beide Präparationen bei einer gleichen Temperatur von 40 °C auf.

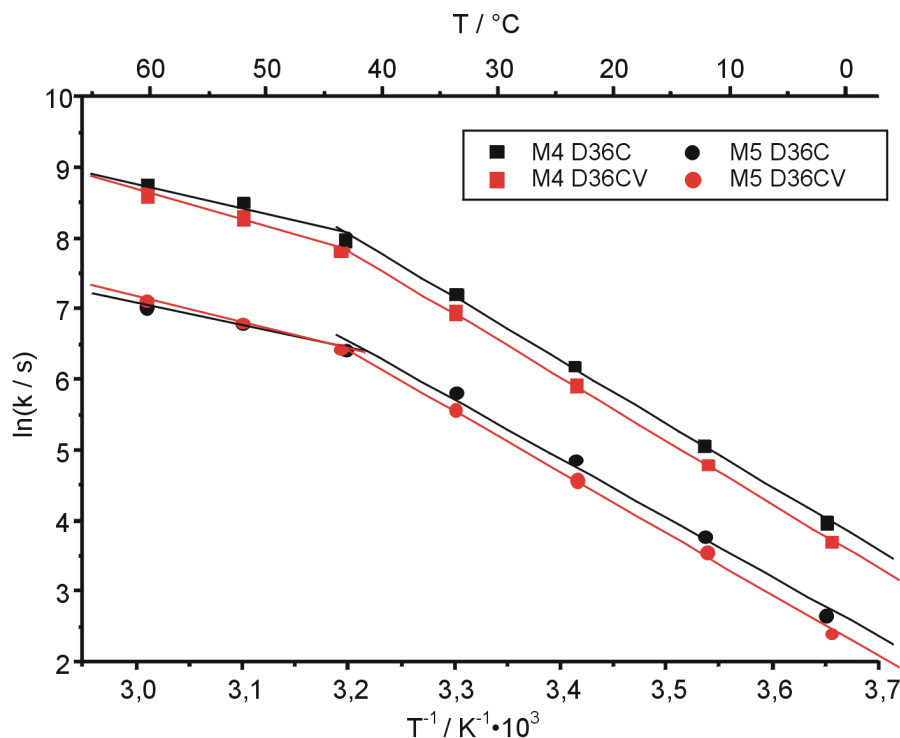


Abbildung 37: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls des M-Intermediats zwischen Papain-verdauter (D36CV) und unverdauter (D36C) Purpurnmembran. Temperaturbereich: 0°C – 60°C, 150 mM KCl, pH 6,96.

Geht man davon aus, daß die Wiederaufnahme der Protonen aus dem wäßrigen Medium mit dem langsamsten Schritt im Zerfall des M-Intermediats korreliert ist, so kann aus der Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten k_{M4} und k_{M5} geschlossen werden, daß der Carboxyterminus an diesem Prozeß beteiligt ist. Die Auswirkung des Carboxyterminus auf die Kinetik der Wiederaufnahme der Protonen ist aber nicht sehr groß und in etwa mit dem Einfluß zu vergleichen, den die Markierung der Purpurnmembran mit Fluorescein verursacht. Bei einer wichtigen funktionellen Bedeutung des Carboxyterminus für die Wiederaufnahme der Protonen sollte dieser Effekt größer sein als aus Abbildung 37 ersichtlich ist. In Abschnitt 6.7 konnte gezeigt werden, daß die schnellere der beiden Komponenten des M-Zerfalls nicht mit der Wiederaufnahme von Protonen korreliert ist. Die bei der Papain-verdauten Membran beobachtete Verlangsamung dieses Prozesses kann daher nicht über eine Beteiligung des Carboxyterminus an der „Protonenantenne“ vermittelt sein.

6.8.2 Einfluß der kovalenten Bindung von Fluorescein auf den Photozyklus

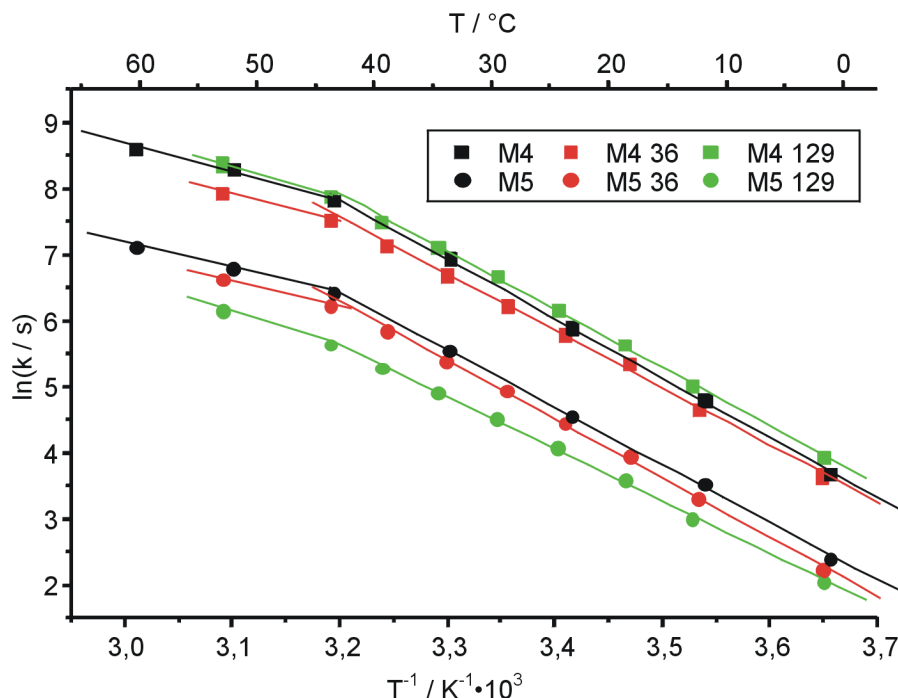


Abbildung 38: Arrhenius-Diagramm für die zwei Ratenkonstanten k_{M4} und k_{M5} des Zerfalls des M-Intermediats in der Papain-verdauten Purpurmembra-
 der Mutante D36C. Die Werte für die beiden markierten Purpurmembra-
 nen und die unmarkierte Purpurmembra-
 nen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt
 (grün: Fluorescein an K129; rot: Fluorescein an C36; schwarz: unmarkiert). (Tem-
 peraturbereich: 0°C – 60°C, 150 mM KCl, pH 6,96)

Die kovalente Bindung von Derivaten des pH-Indikators Fluorescein an die zytoplasma-
 tische und die extrazelluläre Seite der Papain-verdauten D36C-Purpurmembra-
 nen (Abbildung 38) wirkt sich auf deren Photozyklus in einer ähnlichen Weise aus wie bei der
 unverdauten Purpurmembra-
 nen (Abbildung 30) : Während der Aufbau des M-Intermediats
 nur geringfügig beeinflusst wird (nicht dargestellt), besteht ein Einfluß der Markierung auf
 den Zerfall des M-Intermediats. Insgesamt ist dieser Effekt jedoch etwas kleiner als bei der
 nicht verdauten Purpurmembra-
 nen und wirkt sich nur auf die langsame Phase des Zerfalls
 des M-Intermediats aus. Die schnellere Komponente des Zerfalls des M-Intermediats ist
 hingegen nicht beeinflusst. Auf die langsamere Komponente des Zerfalls wirkt sich sowohl
 die Markierung an Cys 36 als auch die an Lys 129 verlangsamernd aus. Hier ist, wie bei
 der unverdauten Membran, der Einfluß von Fluorescein an Lys 129 stärker ausgeprägt

als der von Fluorescein an Cys 36 und verlangsamt diese Komponente im Vergleich zur unmarkierten, verdauten Purpurmembran etwa um den Faktor zwei.

6.8.3 Protonentranslokation an Papain-verdauter Purpurmembran

Die in Abbildung 39 und Tabelle 8 dargestellte Kinetik der Protonentranslokation an der Papain-verdauten Purpurmembran bei einer Temperatur von 20 °C entspricht in der Abfolge der Protonierung der Indikatoren weitgehend der, der nicht verdauten Membran, während es in der Abfolge der Deprotonierung der Indikatoren Unterschiede zur unverdauten D36C-Purpurmembran gibt. Die nach der Anregung des Bacteriorhodopsins freigesetzten Protonen können mit Fluorescein an Position K129 auf der extrazellulären Seite der Membran mit einer Zeitkonstanten von 117 μs nachgewiesen werden. Auf der zytoplasmatischen Seite der Membran werden die Protonen durch Fluorescein an C36 mit einer Zeitkonstanten von 202 μs detektiert und schließlich mit einer Zeitkonstanten von 318 μs von Pyranin in der wässrigen Phase angezeigt. Die für die Protonierung der drei Indikatoren gefundenen Zeitkonstanten entsprechen in etwa denen für die unverdaute D36C-Mutante der Purpurmembran. Damit ist die Protonierung von Pyranin wiederum sehr viel schneller als beim Wildtyp der Purpurmembran.

	F129	F36	Pyranin
$\tau_1 / \mu\text{s}$	117	202	318
τ_2 / ms	0,715	0,704	18,3
τ_3 / ms	15,0	6,13	

Tabelle 8: *Ermittelte Zeitkonstanten aus den in Abbildung 39 dargestellten transienten Absorptionsänderungen für Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wässrigen Phase an der Papain-verdauten D36C-Mutante der Purpurmembran.*

Wie schon bei der unverdauten D36C-Mutante der Purpurmembran sind die Zeitkonstanten der ersten Phase der Deprotonierung von Fluorescein an Lys 129 und Cys 36 größer als die Zeitkonstante der Protonierung von Pyranin, so daß eine Kopplung dieser Prozesse aus den Daten in Tabelle 8 nicht geschlossen werden kann. Im Unterschied zu der unverdauten Mutante sind diese beiden Zeiten für die Indikatoren auf beiden Seiten

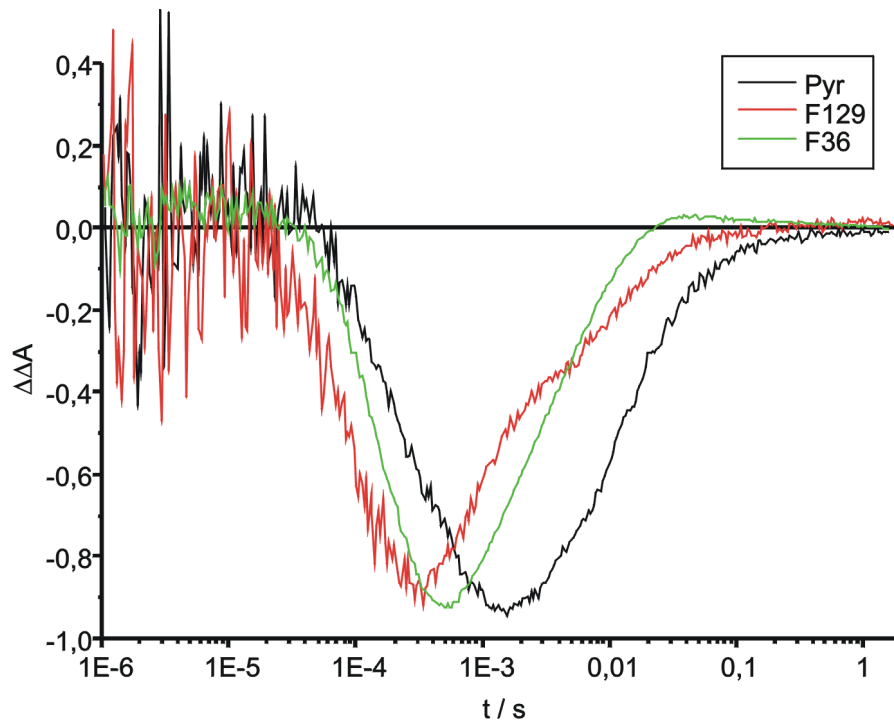


Abbildung 39: Vergleich der Protonierungskinetik an der Papain-verdauten Purpurmembra von membrangebundenem Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wäßrigen Phase in 150 mM KCl bei 20°C und neutralem pH-Wert. Die Amplituden der Signale sind auf einen Werte von $\Delta\Delta A = 1$ normiert.

der Membran aber gleich groß und entsprechen von ihrem Zahlenwert der Deprotonierung von Fluorescein am Wildtyp der Purpurmembra.

Für den letzten Schritt der Deprotonierung der Indikatoren, die Wiederaufnahme der Protonen durch die Purpurmembra besteht hingegen ein Unterschied zwischen der verdauten und der unverdauten Purpurmembra. Während die vom Fluorescein an C36 und an K129 detektierten Zeitkonstanten dieser Prozesse für die Papain-verdaute Purpurmembra etwa um den Faktor zwei kleiner sind als für die unverdaute Membran, zeigt das Pyraninsignal der verdauten Purpurmembra mit 18,3 ms eine etwa 2,5fach langsamere Deprotonierung des Pyranins als im Fall der unverdauten Purpurmembra.

Die Ergebnisse des Einflusses des Carboxyterminus auf die Protonentranslokation lassen sich mit Experimenten von Schmid (1996) vergleichen. In seiner Arbeit hat er die Kinetik von Photozyklus und Protonentranslokation an verdauter und unverdauter Purpurmembra des Wildtyps verglichen, die jedoch zuvor mit 1-Ethyl-3-(–dimethylaminopropyl)–

carbodiimid (EDC) umgesetzt waren. EDC reagiert mit den Carboxylgruppe von Glu 74, Glu 234 und Asp 38 und neutralisiert deren Ladung (*Renthal et al., 1995*). Aus seinen Untersuchungen kommt *Schmid (1996)* zu dem Ergebnis, daß sowohl die Markierung der Purpurmembran mit EDC als auch die anschließende Verdauung mit Papain nur geringe Auswirkungen auf die Kinetik der Freisetzung der Protonen hat. Die Wiederaufnahme der Protonen wurde in seinen Experimenten sehr stark von der Modifizierung der Purpurmembran beeinflusst. Für die native Purpurmembran fand *Schmid (1996)* eine Zeitkonstante für die Deprotonierung von Pyranin von 8,3 ms. Die Kinetik der Deprotonierung von Pyranin konnte für die EDC-markierte Purpurmembran nur mit einer Summe aus zwei Exponentialtermen angepaßt werden, wobei sich zwei Zeitkonstanten von 25 ms und 550 ms ergaben. Die Deprotonierungskinetik der anschließend mit Papain verdauten Membran konnte ebenfalls nur mit zwei Zeitkonstanten angepaßt werden. Hierfür wurden Werte von 29 ms und 420 ms ermittelt. Trotz der großen Abweichung dieser Zahlenwerte von den in dieser Arbeit ermittelten, lassen sich die Ergebnisse vergleichen, wenn man davon ausgeht, daß die starke Verlangsamung der Deprotonierung von Pyranin durch die vorausgegangene Markierung der Membran mit EDC verursacht wird. Die anschließende Verdauung der Membran mit Papain hatte bei *Schmid (1996)* nur einen relativen geringen Einfluß auf die Deprotonierung des Pyranins, was mit den, im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten, übereinstimmt.

Thiedemann (1994) kommt beim Vergleich von Photozyklus und Protonentranslokation an verdauter und unverdauter Purpurmembran des Wildtyps zu dem Ergebnis, daß sich sowohl der Aufbau des M-Intermediats als auch dessen Zerfall beschleunigen, wenn der Carboxyterminus des Bacteriorhodopsins entfernt wird. Für den Austausch der Protonen mit der wäßrigen Phase stellte *Thiedemann (1994)* ebenfalls eine leichte Beschleunigung von Protonierung und Deprotonierung des Pyranins bei Entfernung des Carboxyterminus fest. Seine Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu dem in dieser Arbeit ermittelten Einfluß des Carboxyterminus auf Photozyklus und Protonentranslokation und damit auch im Widerspruch zu der Auffassung, daß der Carboxyterminus an der Wiederaufnahme von Protonen aus der wäßrigen Phase konstruktiv beteiligt ist. Ein detaillierter Vergleich mit den einzelnen Daten von *Thiedemann (1994)* ist auch hier nicht möglich, da er die Kinetik des M-Intermediats mit einer Summe aus sieben Exponentialtermen angepaßt hat und die Kinetik der transienten Absorptionsänderungen des Pyranins mit Summen aus 3 bis 4 Exponentialtermen.

Im Unterschied zur Protonentranslokation bei 20 °C zeigt die in Abbildung 40 dargestellte Temperaturabhängigkeit der Protonenfreisetzung an Papain-verdauter D36C-Purpurchmembran eine erhebliche Differenz zur Kinetik der Protonentranslokation an unverdauter D36C-Purpurchmembran in Abbildung 34. Bei der unverdauten Purpurchmembran bleibt das Verhältnis der mit den verschiedenen Indikatoren detektierten Zeitkonstanten für die Protonenfreisetzung über den gesamten Temperaturbereich in etwa konstant. D.h. alle drei Prozesse besitzen in etwa die gleiche Aktivierungsenergie von etwa 39 kJ mol⁻¹ (Tabelle 6, Seite 105). Im gesamten Temperaturbereich können die freigesetzten Protonen bei der unverdauten Purpurchmembran zunächst durch Fluorescein an K129 detektiert werden, dann durch Fluorescein an C36 und schließlich durch Pyranin in der wässrigen Phase. Alle beteiligten Prozesse werden also von einer Temperaturänderung in ähnlichem Ausmaß beeinflusst.

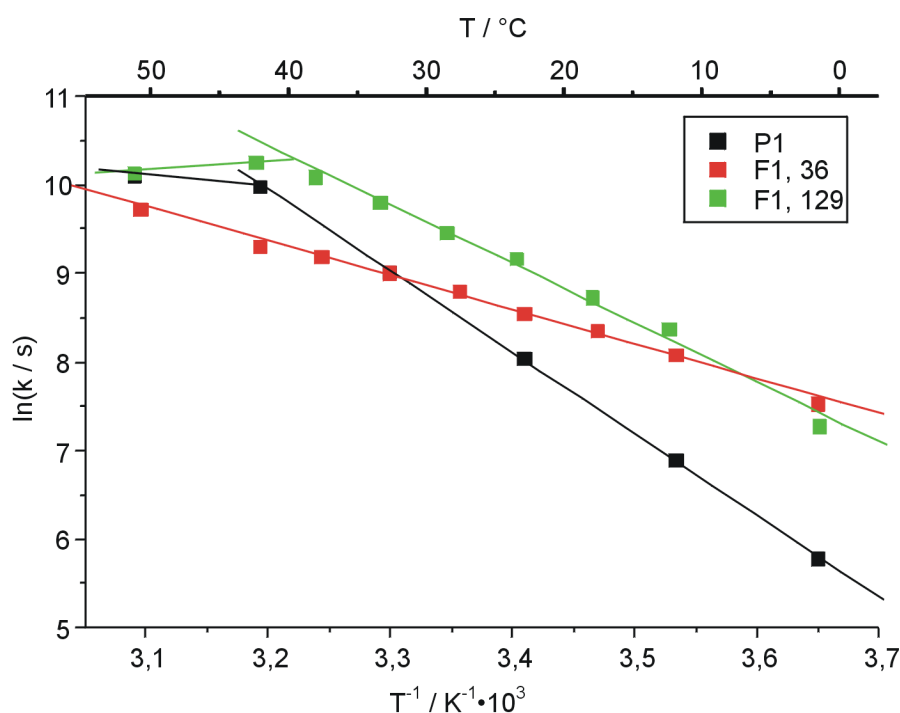


Abbildung 40: Temperaturabhängigkeit der Protonierung von membrangebundenem Fluorescein an C36, K129 und Pyranin in der wässrigen Phase an der Papain-verdauten Purpurchmembran (150 mM KCl, 20 °C, pH 6,96).

Für die Papain-verdaute Purpurchmembran gilt diese Abfolge der Geschwindigkeitskonstanten nur in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 30 °C. Bei einer Temperatur von 1 °C wird die Protonierung von Fluorescein an C36 in etwa mit der gleichen Geschwindig-

keit detektiert wie die Protonierung von Fluorescein an K129. Bei höheren Temperaturen ist dagegen die Differenz der Geschwindigkeitskonstanten der Protonierung der beiden Fluorescein-markierten Proben größer, als es für die unmarkierte Purpurmembraan festgestellt wurde. Für die Diffusion der Protonen entlang der Membranoberfläche bedeutet dies, daß die Diffusion mit sinkender Temperatur schneller wird und bei Temperaturen unterhalb 10 °C schneller ist als die freie Diffusion von Protonen in Wasser. Auch die Protonierung von Pyranin in der wäßrigen Phase weist erhebliche Unterschiede in der Kinetik zwischen der Papain-verdauten und der unverdauten Membranpräparationen auf. Bei niedrigen Temperaturen verläuft die Protonierung des Pyranins durch die Papain-verdaute Membran sehr viel langsamer als bei der nicht verdauten Membran (bei 0 °C 3fach langsamer). Mit zunehmender Temperatur steigt die Geschwindigkeit dieser Protonierung im Gegensatz zu unverdauten Probe stärker an als die Geschwindigkeit der Protonierung von Fluorescein. Bei 30 °C verlaufen die Protonierung von Pyranin und Fluorescein an C36 mit gleichen Geschwindigkeiten. Bei höheren Temperaturen wird Pyranin sogar schneller protoniert als das Fluorescein auf der zytoplasmatischen Seite der Membran. Die Geschwindigkeit der Protonierung von Pyranin nähert sich mit steigender Temperatur auch der Geschwindigkeit der Protonierung von Fluorescein an K129 an und bei 50 °C sind sogar beide Geschwindigkeitskonstanten identisch. Das heißt, es besteht kein zeitlicher Unterschied mehr zwischen der Protonierung eines Indikators an der extrazellulären Öffnung des Membrankanals zur Protonierung eines Indikators in der wäßrigen Phase.

Wiedergegeben werden diese Unterschiede in der Protonierungskinetik zwischen der Papain-verdauten Purpurmembraan und der unverdauten Membran auch durch die Aktivierungsenergien dieser Protonierungsprozesse. Alle drei Protonierungsprozesse der Indikatoren an der unmarkierten Purpurmembraan besitzen Aktivierungsenergien zwischen 33,5 kJ mol⁻¹ und 40,2 kJ mol⁻¹. Bei der verdauten Purpurmembraan liegen diese weit auseinander (Tabelle 9). Die Aktivierungsenergie für die Protonierung von Fluorescein an K129 ($F_{1,129}$) ist bei der Papain-verdauten Probe etwa 20 % größer als bei der unverdauten Probe, die Aktivierungsenergie für die Protonierung von Fluorescein an C36 ($F_{1,129}$) um etwa den gleichen Betrag kleiner. Die Aktivierungsenergie für die Protonierung von Pyranin weist hingegen bei der Papain-verdauten Purpurmembraan mit 76,5 kJ mol⁻¹ einen mehr als doppelt so großen Wert auf wie bei der unverdauten Membran. Im Vergleich dazu sind die Aktivierungsenergien der Deprotonierung der Indikatoren sehr viel weniger von der Entfernung des Carboxyterminus beeinflusst.

	$F_{1,129}$	$F_{2,129}$	$F_{3,129}$	$F_{1,36}$	$F_{2,36}$	$F_{3,36}$	P_1	P_2
D36CV E_a / kJ mol^{-1}	52,8	44,2	54,8	34,2	56,8	61,7	76,5	77,2
D36C E_a / kJ mol^{-1}	39,7	34,5	51,8	40,2	40,3	74,6	33,5	60,2

Tabelle 9: Aktivierungsenergien der Protonentransferprozesse an der Papain-verdauten (D36CV) und der unverdauten (D36C) D36C-Mutante der Purpurmembraan (150 mM KCl, pH 6,96).

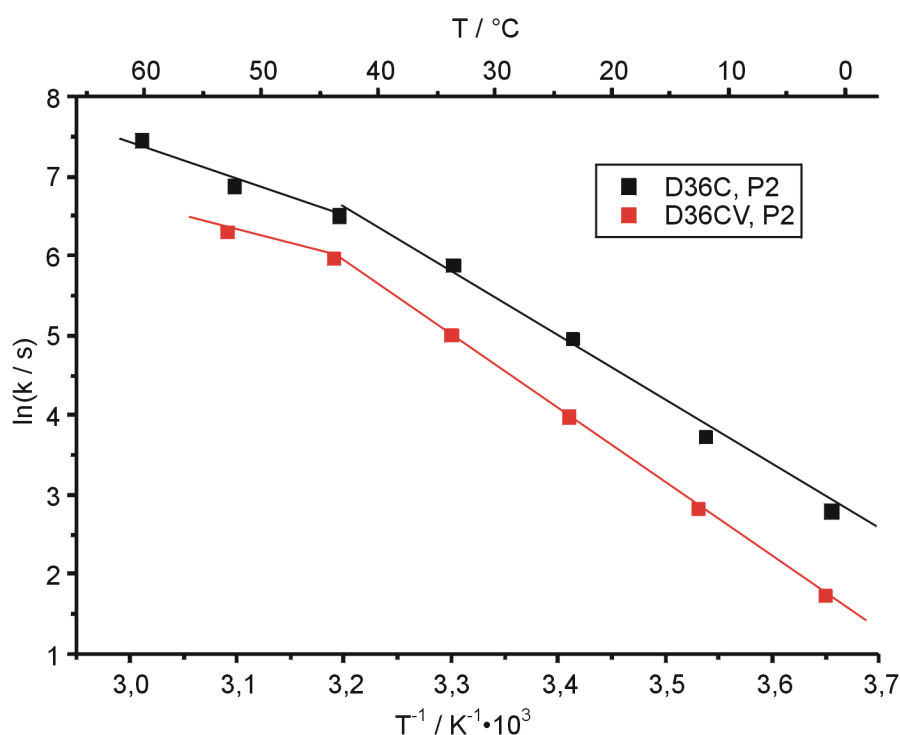


Abbildung 41: Temperaturabhängigkeit der Deprotonierung von Pyranin in der wässrigen Phase an der Papain-verdauten (D36CV) und unverdauten (D36C) D36C-Mutante der Purpurmembraan (150 mM KCl, 20°C, pH 6,96).

Der letzte Schritt der Protonentranslokation, die Wiederaufnahme von Protonen durch die Purpurmembraan, kann anhand der Deprotonierung von Pyranin in der wässrigen Phase verfolgt werden. Der in Abbildung 41 dargestellte Vergleich dieses Prozesses zwischen der Papain-verdauten und der unverdauten Purpurmembraan bestätigt, daß die Protonen von der Papain-verdauten Purpurmembraan im gesamten Temperaturbereich langsamer aufgenommen werden als von der unverdauten Membran. Bei niedrigen Temperaturen ist dieser Prozeß an der Papain-verdauten Purpurmembraan um den Faktor drei langsamer, bei höheren Temperaturen dagegen nur noch um den Faktor 1,5.

6.9 Photozyklus und Protonentranslokation von delipidierte Purpurmembran

Neben der Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung (Abschnitt 6.10) und der Abspaltung des carboxyterminalen Endes der Peptidkette des Proteins (Abschnitt 6.8) bieten die Solubilisierung und die Delipidierung der Purpurmembran weitere Möglichkeiten, die Ladungsverteilung an der Oberfläche der Purpurmembran zu beeinflussen. Bei der Delipidierung wird ein Teil der ursprünglich in der Membran enthaltenen Lipide durch eine Behandlung mit dem Detergens CHAPS entfernt. Die Anordnung des Bacteriorhodopsins in der Purpurmembran als zweidimensionales, hexagonales Gitter aus Trimeren bleibt dabei jedoch erhalten. Nach einer Behandlung mit CHAPS bleiben etwa 30 % der ursprünglichen Lipide erhalten.

Durch eine zweite Delipidierung mit dem Detergens β -D-Dodecylmaltosid (DDM) kann dieser Anteil der verbleibenden Lipide auf 20 % reduziert werden. Bei der Behandlung der Purpurmembran mit DDM wird ein Teil des Bacteriorhodopsins aus der Membran herausgelöst und liegt dann solubilisiert in der Lösung vor. Das solubilisierte Bacteriorhodopsin ist in Detergens-Micellen eingebettet, die zusätzlich die Lipide der Purpurmembran enthalten.

Da etwa 70 % der in der Purpurmembran vorhandenen Lipide negative Ladungen tragen (Kates *et al.*, 1982), wird bei der Delipidierung mit der Entfernung der Lipide auch ein Teil der negativen Ladung von den beiden Oberflächen der Purpurmembran entfernt. Weil die Lipide in der Purpurmembran den Raum zwischen den Bacteriorhodopsin-Molekülen auffüllen, rücken die Proteine in der delipidierten Membran näher aneinander, was sich in einer Verringerung der Gitterkonstanten (Glaeser *et al.*, 1985) von 62,5 Å in der nativen Purpurmembran auf 56,6 Å in der delipidierten Purpurmembran widerspiegelt (Fitter *et al.*, 1997). Gleichzeitig verringert sich die molekulare Dynamik des Bacteriorhodopsins. Neben der Änderung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Lipid und Bacteriorhodopsin ändern sich damit auch die nichtionischen Wechselwirkungen dieser beiden Bestandteile der Purpurmembran. Durch den verringerten Abstand der Bacteriorhodopsin-Moleküle zueinander besteht die Möglichkeit, daß auch die Protein-Protein-Wechselwirkungen von der Delipidierung beeinflußt werden. Bei der Solubilisierung des Bacteriorhodopsins sind diese Änderung in der Umgebung des Proteins noch

sehr viel drastischer: Die Protein–Lipid–Wechselwirkungen werden durch Wechselwirkungen mit dem Detergens ersetzt, welches im Falle von DDM keine Ladung trägt und sich von den Strukturen seines Kopf- und Schwanzbereiches deutlich von denen der Lipide unterscheidet. Durch die Vereinzelung der Proteine in Detergens–Micellen werden außerdem Interproteinwechselwirkungen aufgehoben. Aufgrund der Struktur der Micellen ist die Wegstrecke von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Öffnung des Protonenkanals durch die wäßrige Phase im Vergleich zur Purpurmembran deutlich verkürzt.

6.9.1 Photozykluskinetik von delipidierter Purpurmembran

In Abbildung 42 und 43 sind die transienten Absorptionsänderungen der beiden mit CHAPS und CHAPS & DDM delipidierten Proben, einer solubilisierten Probe und von nativer Purpurmembran zum Vergleich bei den Wellenlängen 568 nm und 412 nm (M–Intermediat) dargestellt. Die aus der Anpassung erhaltenen Zeitkonstanten finden sich in Tabelle 22 auf Seite 181.

Signifikant ist, daß sich die Kinetik des M–Intermediats in nativer Purpurmembran mit fünf Exponentialtermen anpassen läßt, während für eine Anpassung der Kinetik der delipidierten Purpurmembran sechs Exponentialterme nötig sind. Ein Vergleich der relativen Amplituden zeigt, daß diese unterschiedliche Anzahl von Exponentialtermen aber durchaus miteinander vergleichbar ist: Die Größe der relativen Amplituden, die den Aufbau des M–Intermediats beschreiben ($A_{M1} - A_{M3}$), stimmen für die delipidierten und die native Probe in etwa überein. Auch die relativen Amplituden des schnellsten Zerfallsprozesses des M–Intermediats (A_{M4}) sind für diese drei Proben vergleichbar. Lediglich der letzte Zerfallsschritt des M–Intermediats (A_{M5}) in der nativen Purpurmembran spaltet sich bei den beiden delipidierten Proben in zwei Prozesse auf (A_{M5} , A_{M6}). Ein anderes Bild ergibt sich beim Vergleich der Kinetik der nativen Purpurmembran mit dem solubilisierten Bacteriorhodopsin. Obwohl auch hier die Kinetik des M–Intermediats wie bei den delipidierten Proben mit sechs Exponentialtermen angepaßt werden müssen, ergibt sich eine völlig unterschiedliche Verteilung der relativen Amplituden auf die einzelnen Prozesse. Die Zeitkonstanten der einzelnen Aufbau- und Zerfallsschritte des M–Intermediats im solubilisierten Bacteriorhodopsin sind daher nicht direkt mit denen in der delipidierten oder der nativen Purpurmembran vergleichbar.

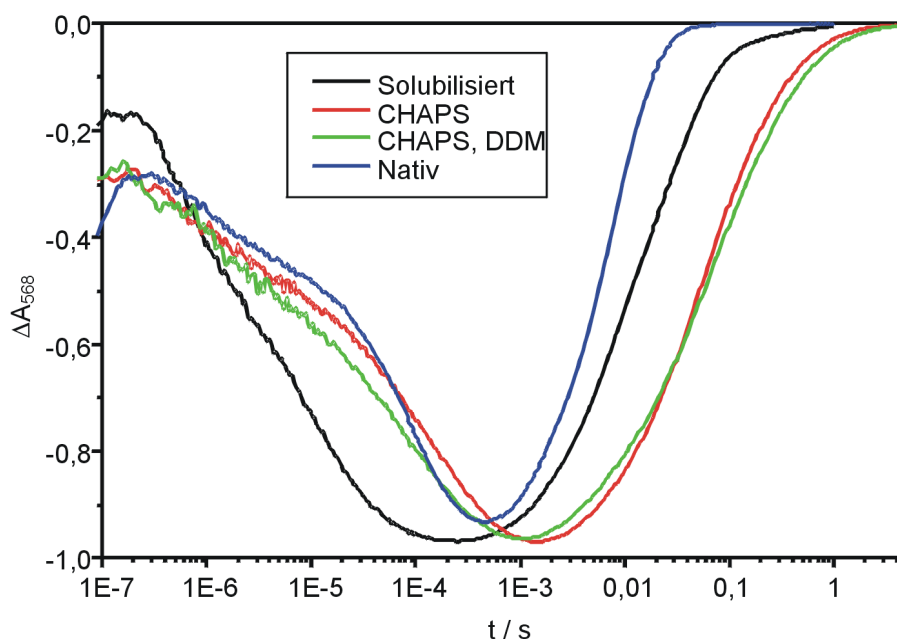


Abbildung 42: Vergleich der transienten Absorptionsänderungen bei 568 nm der delipidierten Purpurmbranen (CHAPS: ca. 30 % Restlipid, CHAPS; DDM: ca. 20 % Restlipid) und des solubilisierten BRs mit nativer PM (150 mM KCl, 20°C, pH 6,96). Alle dargestellten Kurven sind auf einer Absorptionsänderung von $\Delta A = 1$ normiert.

Die Delipidierung der Purpurmbran wirkt sich auf den Zerfall des M-Intermediats sehr viel stärker aus als auf dessen Aufbau. Der schnellste und der langsamste Prozeß beim Aufbau des M-Intermediats sind in beiden delipidierten Proben etwa um den Faktor zwei langsamer als in der nativen Purpurmbran, wobei diese beiden Prozesse in der mit CHAPS und n-Dodecylmaltosid delipidierten Probe (ca. 20 % Restlipid) schneller ablaufen als in der nur mit CHAPS delipidierten Probe (ca. 30 % Restlipid). Die Zeitkonstante τ_{M2} ist in der einfach delipidierten Purpurmbran geringfügig größer als die der nativen Purpurmbran, während bei der zweifach delipidierten Purpurmbran eine etwas kleinere Zeitkonstante als die der nativen Purpurmbran beobachtet werden kann. Unter Berücksichtigung der relativen Amplituden für die einzelnen Prozesse des Aufbaus ergibt sich, daß der Aufbau des M-Intermediats in der zweifach delipidierten Purpurmbran im Vergleich zur nativen Membran geringfügig langsamer abläuft, während dieser Prozeß bei der einfach delipidierten Purpurmbran etwa um den Faktor zwei verzögert ist.

Der Vergleich der Zeitkonstanten für den Zerfall des M-Intermediats zwischen den bei-

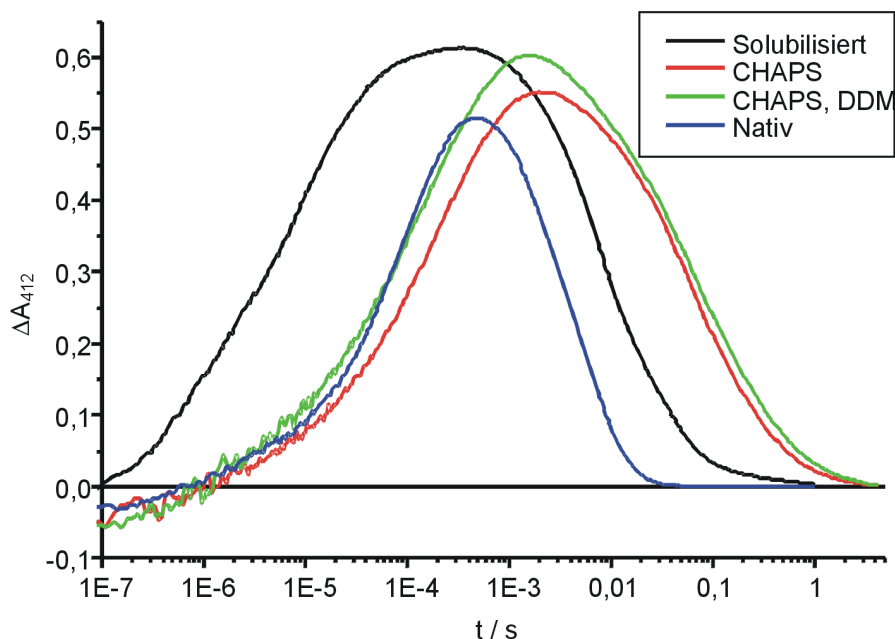


Abbildung 43: Vergleich der transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm der delipidierten Purpurmbranen (CHAPS: ca. 30 % Restlipid, CHAPS + DDM: ca. 20 % Restlipid) und des mit DDM solubilisierten BRs mit nativer PM (150 mM KCl, 20°C, pH 6,96). Die Punkte auf den Kurven geben die angepaßten Zeitkonstanten wieder. Alle dargestellten Kurven sind auf einer Absorptionsänderung von $\Delta A = 1$ bei einer Wellenlänge von 568 nm normiert.

den delipidierten Proben ergibt ein analoges Bild wie beim Aufbau des M-Intermediats: Auch hier laufen die Prozesse in der zweifach delipidierten Purpurmbran geringfügig schneller (τ_{M5} , τ_{M6}), bzw. doppelt so schnell ab (τ_{M3}). Ein Vergleich mit der Kinetik der nativen Purpurmbran ist aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Exponentialtermen erschwert. Die Zeitkonstante τ_{M4} ist jedoch bei den delipidierten Proben fünf bis 10fach so groß wie die der nativen Purpurmbran. Die Zeitkonstanten τ_{M5} und τ_{M6} , die zusammen mit der Zeitkonstanten τ_{M5} der nativen Purpurmbran zu vergleichen sind, sind sogar um den Faktor 12 bis 90 größer. Insgesamt ergibt sich daraus das Bild, daß der Zerfall des M-Intermediats in der delipidierten Purpurmbran um mehr als den Faktor 10 langsamer abläuft als in der nativen Membran, wobei auch hier wieder die mit CHAPS und n-Dodecylmaltosid delipidierten Probe eine schnellere Kinetik zeigt als die nur mit CHAPS delipidierte.

Die Unterschiede in der Kinetik zwischen solubilisiertem BR und nativer Purpurm-

bran lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der relativen Amplituden und der unterschiedlichen Anzahl an Exponentialtermen nur schwer quantifizieren. Aus dem Verlauf der transienten Absorptionsänderungen läßt sich aber schließen, daß der Aufbau des M-Intermediats im solubilisierten Bacteriorhodopsin etwa 20fach schneller ist als in der nativen Purpurmbran, während der Zerfall des M-Intermediats im solubilisierten Bacteriorhodopsin etwa um den Faktor drei langsamer ist, was mit Daten von *Alexiev et al. (1994a)* übereinstimmt.

6.9.2 Kinetik des Protonentransfers an delipidierte Purpurmbran

Die in Abbildung 44 dargestellte Kinetik des Protonenaustausches zwischen Bacteriorhodopsin und der wäßrigen Phase wird stark von der Delipidierung bzw. Solubilisierung der Purpurmbran beeinflusst. Wie schon in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt, liefert eine Anpassung der mit Pyranin detektierten Protonenaustauschkinetik mit zwei Exponentialtermen eine gute Wiedergabe des Kurvenverlaufes für den Wildtyp der Purpurmbran, die D36C-Mutante und für in Vesikel rekonstituiertes Bacteriorhodopsin. Eine solche Anpassung der Protonenaustauschkinetik der delipidierten Proben mit zwei Exponentialtermen ist in Abbildung 44 als gestrichelte Linie dargestellt. Wie zu erkennen ist, liefert diese Anpassung nur eine unzureichende Wiedergabe des tatsächlichen Kurvenverlaufes. Sie kann aber mit herangezogen werden, um die Kinetik der delipidierten Proben mit den Kinetiken der solubilisierten und der nativen Probe zu vergleichen. Um die Kinetik des Protonenaustausches an delipidierter Purpurmbran richtig wiederzugeben, ist eine Anpassung mit vier Exponentialtermen nötig. Diese steht im Einklang mit der Literatur (*Verclas, 1998*).

Sowohl die Abgabe der Protonen ins wäßrige Medium als auch deren Wiederaufnahme laufen bei der delipidierten Purpurmbran langsamer ab als bei der nativen. Ähnlich wie beim Aufbau und Zerfall des M-Intermediats ist auch bei der Protonenaustauschkinetik die zweite Hälfte des Signals, also die Wiederaufnahme der Protonen, stärker von der Delipidierung beeinflusst als die erste Hälfte. Vergleicht man die Austauschkinetik der beiden delipidierten Proben bei einer Anpassung mit zwei Exponentialtermen mit der Kinetik der nativen Purpurmbran, so zeigt sich, daß die Freisetzung der Protonen ins wäßrige Medium bei der mit CHAPS delipidierten Membran 3,5fach langsamer verläuft

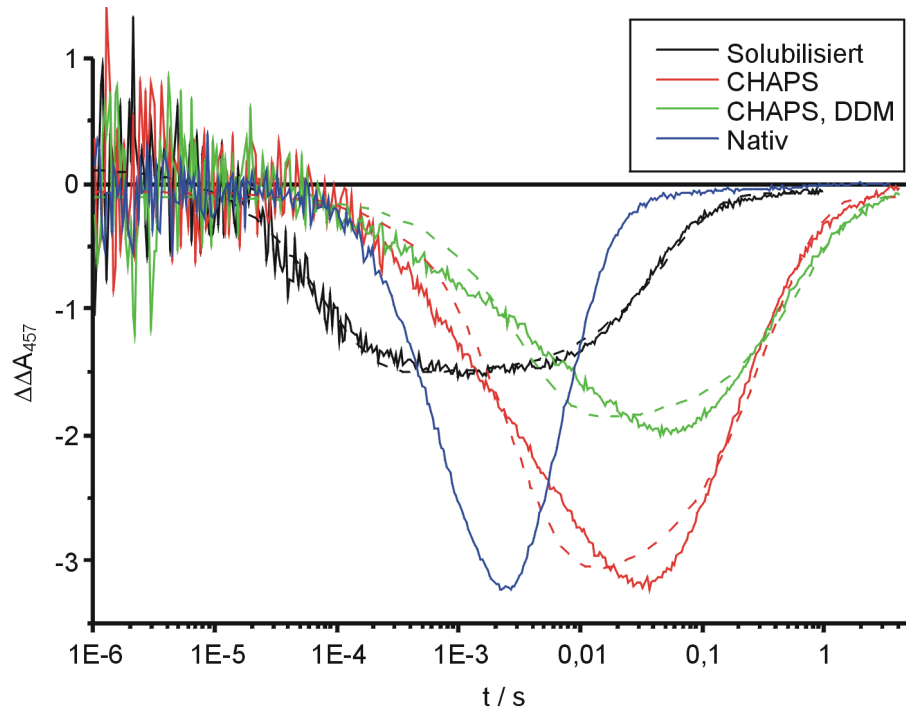


Abbildung 44: Vergleich der Protonenaustauschkinetik mit der wäßrigen Phase von delipidierten Purpurmbranen (CHAPS: ca. 30 % Restlipid, CHAPS; DDM: ca. 20 % Restlipid) und mit DDM solubilisiertem BR mit nativer PM (150 mM KCl, 20°C, 25 μ M Pyranin, pH 6,96).

als an der nativen Membran und im Falle der mit CHAPS und n-Dodecylmaltosid delipidierten Membran 4,5fach langsamer. Die Beeinflussung der Protonierung von Pyranin durch die Delipidierung ist damit sehr viel größer als die Beeinflussung des Aufbaus des M-Intermediats. Die Wiederaufnahme der Protonen aus dem wäßrigen Medium ist bei der einfach delipidierten Purpurmbran um den Faktor 45 und bei der zweifach delipidierten Purpurmbran um den Faktor 90 verzögert. Die Anpassung der Protonenaustauschkinetik für die delipidierte Purpurmbran mit vier Exponentialtermen zeigt, daß sich sowohl die Protonenfreisetzung als auch die Wiederaufnahme in jeweils zwei Prozesse aufspalten. Dabei ist die erste Zeitkonstante für die Freisetzung der Protonen in die wäßrige Phase an der delipidierten Purpurmbran etwa um den Faktor zwei kleiner als die Zeitkonstante beim Wildtyp der Purpurmbran, während die zweiten Zeitkonstanten der beiden delipidierten Purpurmbran, welche zwei Drittel der Amplitude ausmachen, etwa zehnfach so groß sind wie τ_{P1} des Wildtyps der Purpurmbran. Bei der Wiederaufnahme der Protonen durch die delipidierten Membranen sind hingegen beide Zeitkonstanten (τ_{P3} , τ_{P4})

sehr viel größer als τ_{P2} beim Wildtyp der Purpurmembran. Beim Vergleich der beiden delipidierten Proben miteinander ergibt sich ein uneinheitliches Bild: Während bei der einfach delipidierten Purpurmembran τ_{P1} größer und τ_{P2} kleiner ist als die entsprechenden Zeitkonstanten der zweifach delipidierten Membran, ist bei erster τ_{P3} kleiner und τ_{P4} größer als bei der zweifach delipidierten Membran. Außerdem sind die beiden relativen Amplituden A_{P3} und A_{P4} zwischen den beiden Membranen unterschiedlich.

Die Protonenaustauschkinetik des solubilisierten Bacteriorhodopsins läßt sich befriedigend mit zwei Exponentialtermen beschreiben. Die Freisetzung der Protonen ins wäßrige Medium entspricht mit $81 \mu s$ in etwa der Zeit, die an der nativen Purpurmembran für die Freisetzung der Protonen an der Oberfläche der Purpurmembran mit membrangebundenen Indikatoren gemessen wird. Die Wiederaufnahme Protonen aus dem wäßrigen Medium ist hingegen im Vergleich zur nativen Purpurmembran um den Faktor sieben verzögert.

6.10 Photozyklus und Protonentranslokation von Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen

Um den Einfluß der Lipidphase und insbesondere den Einfluß der Ladung der Lipide auf den Photozyklus des Bacteriorhodopsins und die Protonentranslokation zu untersuchen, wurde Bacteriorhodopsin in Proteoliposomen variierender Zusammensetzung rekonstituiert. Die Archaeolipide (vgl. Abschnitt 3.6.1, Seite 16), die in der Purpurmembran die natürliche Lipidphase der Membran bilden, werden bei der Rekonstitution von BR in Liposomen nicht aus dem System entfernt, sondern durch die Lipide der vorgefertigten Vesikel verdünnt. Durch den Überschuß der hinzugefügten Lipide gegenüber den Archaeolipiden werden die Eigenschaften der Lipidphase der Proteoliposomen hauptsächlich durch die Lipide der vorgefertigten Liposomen bestimmt.

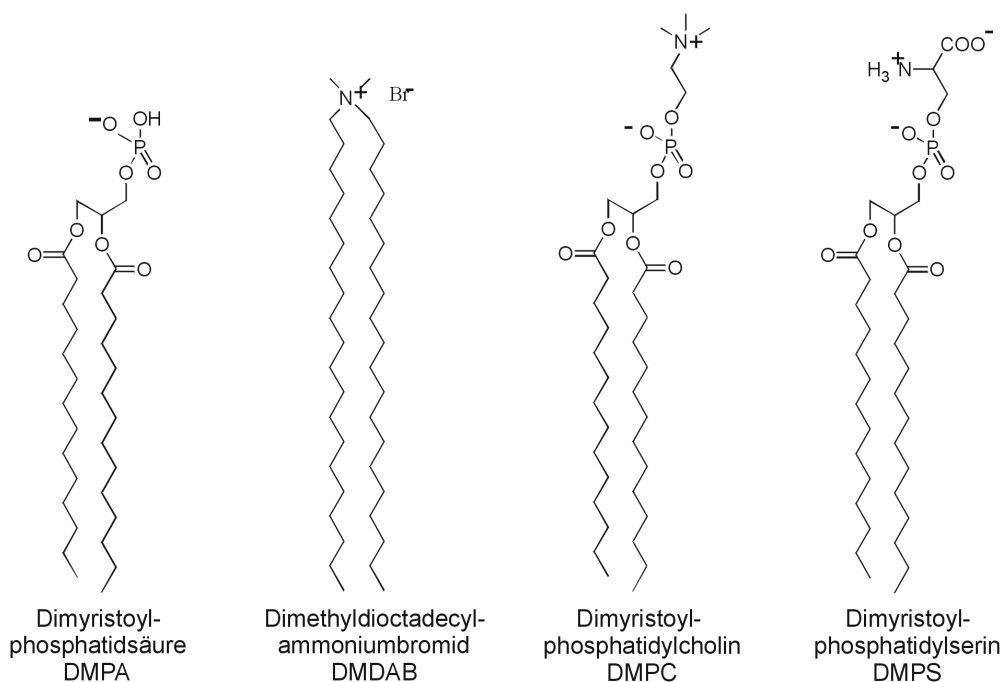


Abbildung 45: Strukturformeln der zur Rekonstitution von Bacteriorhodopsin in Proteoliposomen eingesetzten Lipide DMPA, DMPC und DMPS und des Lipidanalogs DMDAB. (Anstelle des hier dargestellten DMPS wird PS mit variierenden Fettsäureresten eingesetzt.) Die Strukturformeln geben den Ladungszustand der Lipide bei neutralem pH-Wert wieder.

Die Strukturformeln und der Ladungszustand der eingesetzten Lipide DMPA, DMPC und DMPS und des Lipidanalogs DMDAB bei neutralem pH-Wert sind in Abbildung 45

dargestellt. Das für die Untersuchungen eingesetzte Lipid Phosphatidylserin (PS) aus Rinderhirn ist ein Gemisch, welches abweichend von der Darstellung in Abbildung 45, gesättigte und ungesättigte Fettsäurereste mit unterschiedlichen Kettenlängen enthält.

Um Membranen mit stark unterschiedlichen Oberflächenladungsdichten zu erhalten wurde die Zusammensetzung der Lipidphase über einen weiten Bereich variiert. Als Grundsubstanz für die Lipidphase der Liposomen wurde Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) eingesetzt. DMPC ist bei neutralem pH-Wert ein Zwitterion und damit netto neutral. Der hydrophobe Teil des Lipids besteht aus zwei identischen, gesättigten C₁₄-Fettsäuren.

Zur Erzeugung einer negativen Oberflächenladung wurden dem DMPC unterschiedliche Anteile von Dimyristoylphosphatidsäure (DMPA) und Phosphatidylserin (PS) zugesetzt, die im neutralen pH-Bereich jeweils netto eine negative Ladung tragen. DMPA und PS unterscheiden sich neben der unterschiedlichen Struktur ihrer Kopfgruppen auch in den Fettsäureresten: Während DMPA ausschließlich die gesättigte C₁₄-Fettsäure Myristoylsäure enthält, bestehen die hydrophoben Reste des PS aus einem Gemisch gesättigter und ungesättigter Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge.

Da es in der Natur keine Lipide mit positiv geladener Kopfgruppe gibt, wurde auf das quartäre Ammoniumsalz Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DMDAB) zurückgegriffen, um im Gemisch mit DMPC eine positive Oberflächenladung zu erzeugen. Das DMDAB ist als quartäre Ammoniumsalz einfach positiv geladenen und besitzt am Stickstoffatom zwei Alkylketten mit einer Länge von 18 Kohlenstoffatomen. Strukturell unterscheidet sich das DMDAB von den Lipiden durch seine vergleichsweise kleine Kopfgruppe und die relativ langen hydrophoben Alkylketten.

Das Bacteriorhodopsin befindet sich in der Lipiddoppelschicht nicht in einem starren 2D-Gitter wie in der Purpurmembran. Der Aggregatzustand des Bacteriorhodopsins hängt mit dem Aggregatzustand der Lipidphase zusammen, die von einem flüssigkristallinen Zustand in einen Gelzustand übergehen kann. Der flüssigkristallinen Zustand zeichnet sich dabei gegenüber dem Gelzustand durch eine erhöhte Fluidität der Lipid-Doppelschicht und durch eine größere Beweglichkeit der Kopfgruppen aus. Bei reinen DMPC-Vesikeln findet dieser Phasenübergang bei einer Temperatur von 23 °C statt. Bei Lipiden mit größeren Anteilen ungesättigter Fettsäuren liegt diese Temperatur niedriger. Eine größere Kettenlänge der Fettsäuren bewirkt einen Anstieg der Phasenumwandlungstemperatur. Bei

Temperaturen, die mehr als 10 °C unter der Phasenübergangstemperatur der Lipide liegen, bildet das Bacteriorhodopsin in der Membran Aggregate. Oberhalb dieser Temperatur liegt es in monomerer Form vor (Grzesiek & Dencher, 1986).

Bei der Rekonstitution der Proteoliposomen wird das Bacteriorhodopsin nicht völlig gerichtet in die Membran eingebaut. Es ergibt sich immer eine Verteilung von Bacteriorhodopsin-Molekülen, die aufgrund ihrer Einbaurichtung Protonen aus dem Vesikel herauspumpen, zu Bacteriorhodopsin-Molekülen, die nach innen gerichtet sind und damit Protonen in das Lumen des Vesikels freisetzen. Der Orientierungsgrad des Bacteriorhodopsins hängt dabei sowohl von der Rekonstitutionsmethode als auch von der Zusammensetzung der Vesikel ab. Bei allen Methoden wird eine Bevorzugung der Einbaurichtung beobachtet, bei der das Bacteriorhodopsin Protonen in das Lumen der Vesikel freisetzt. Proteoliposomen mit großen Anteilen einer Einbaurichtung können aus der Gelfiltration einer Vesikelsuspension erhalten werden (Seigneuret & Rigaud, 1988).

Der Orientierungsgrad des Bacteriorhodopsins in den Vesikeln läßt sich biochemisch durch selektive Verdauung der Proteoliposomen mit Papain oder Chymotrypsin und anschließende Analyse der Abbauprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese bestimmen (Burghaus & Dencher, 1984). Spektroskopisch läßt sich der Orientierungsgrad durch den Einsatz optischer pH-Indikatoren bestimmen (Seigneuret & Rigaud, 1985). Bei der Detektion der Protonentranslokation mit Pyranin im wäßrigen Medium außerhalb der Vesikel ergibt sich der Orientierungsgrad des Bacteriorhodopsins auch aus den Amplituden der ersten beiden Phasen des Indikatorsignals. (Ein solches Pyraninsignal von Proteoliposomen ist in Abbildung 47 auf Seite 136 dargestellt.) Die (negative) Amplitude der ersten Phase des Signals ist proportional zur Konzentration der nach außen freigesetzten Protonen, während die Amplitude der zweiten Phase proportional zur Konzentration der von außen aufgenommenen Protonen ist. Da diese beiden Prozesse von Bacteriorhodopsin-Molekülen unterschiedlicher Orientierung verursacht werden, entspricht das Verhältnis der Amplituden des Pyraninsignals direkt dem Orientierungsgrad des Bacteriorhodopsins.

Aus den relativen Amplituden A_{P1} und A_{P2} in den Tabellen 25 bis 27 (Seiten 184ff.) läßt sich entnehmen, daß in den untersuchten Vesikeln eine Orientierung vorlag, in der etwa zwei Drittel des Bacteriorhodopsins nach innen gerichtet sind und ein Drittel nach außen.

Bei der Messung der Protonentranslokation an den Vesikelsystemen ergeben sich Unterschiede zu den Messungen an der Purpurmembran. Diese resultieren daraus, daß es

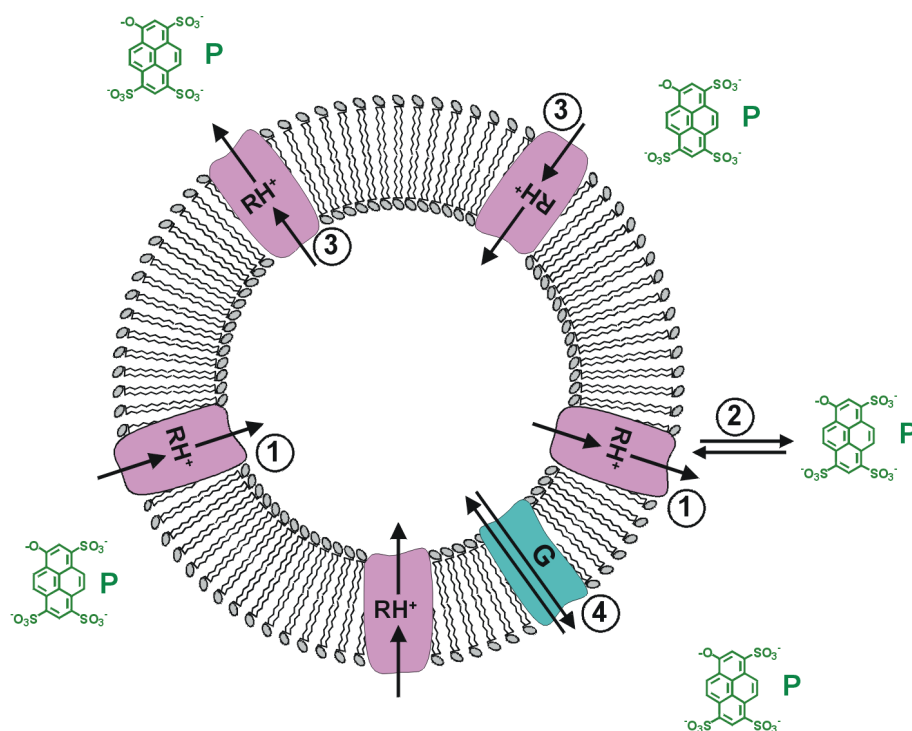


Abbildung 46: Schematische Darstellung des Aufbaus von rekonstituierten Proteoliposomen mit zusätzlich eingefügtem Ionenkanal (blaugrün) und Pyranin in der wässrigen Phase außerhalb der Vesikel. (G: Gramicidin, RH^+ : protonierte Schiff'sche Base, P: Pyranin)

sich bei den Vesikeln um geschlossene Systeme handelt, in denen das Innenvolumen vom Außenvolumen getrennt ist (Abbildung 46). Protonen, die auf der einen Seite der Membran freigesetzt werden, müssen diese zunächst überwinden, um auf die andere Seite der Membran zu gelangen. Auch Substanzen, die der Vesikelsuspension nach der Präparation zugesetzt werden, wie z. B. Pyranin oder Imidazol, liegen für einige Zeit nur im Volumen außerhalb der Vesikel vor und können die Membran in der Regel nur sehr langsam überwinden.

Auch das bei Vesikeln gemessene Indikatorsignal mit Pyranin in der wässrigen Phase unterscheidet sich von dem Signal, das bei der Purpurmembran erhalten wird. Bei der Purpurmembran sind im Pyraninsignal nur zwei Phasen zu beobachten (Abbildung 27, Seite 90): Die Protonierung von Pyranin nach dem Freisetzen der Protonen an der Purpurmembran und die Deprotonierung des Pyranins durch Wiederaufnahme von Protonen durch die Purpurmembran. Im Vesikelsystem kommt beim Pyraninsignal eine dritte Phase hinzu

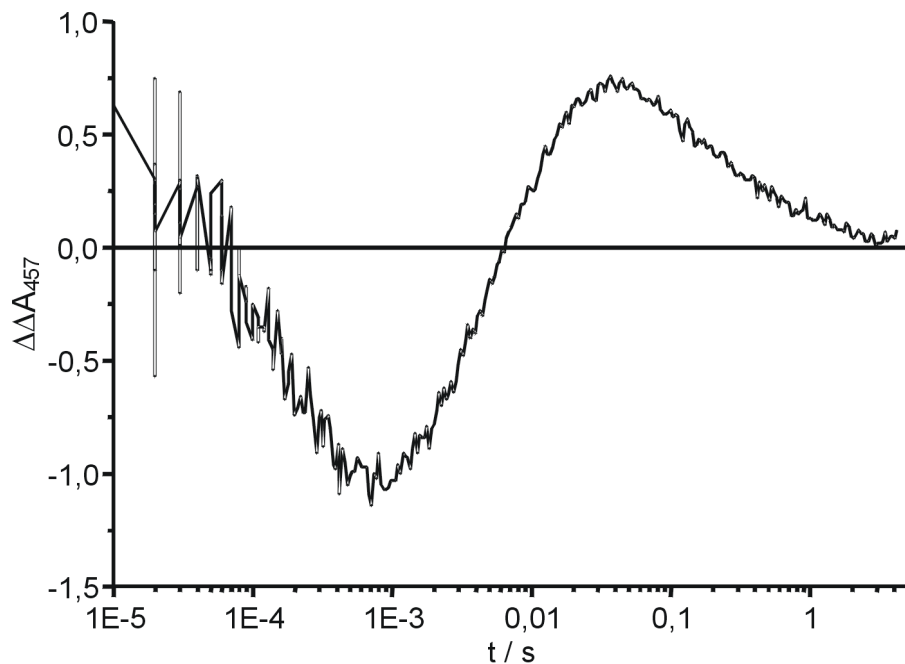


Abbildung 47: *Pyraninsignal der Protonentranslokation an Vesikelsystem.*

(Abbildung 47), wenn sich das Pyranin nur außerhalb oder nur innerhalb des Vesikels befindet. Nach der Lichtanregung des Bacteriorhodopsins in der Lipidmembran werden Protonen an das wäßrige Medium innerhalb und außerhalb der Vesikel abgegeben (①). Da sich Pyranin aber nur außerhalb der Vesikel befindet, werden nur dort die freigesetzten Protonen detektiert (②). Die Protonenfreisetzung in das Lumen des Vesikels entzieht sich einer Detektion. Auch bei der anschließenden Wiederaufnahme von Protonen durch das Bacteriorhodopsin werden nur Protonen detektiert, die aus dem äußeren Medium aufgenommen werden. Da der Anteil der Bacteriorhodopsin-Moleküle, die Protonen in das Lumen des Vesikels abgeben, größer ist als der Anteil der Moleküle, die Protonen aus dem Vesikel herauspumpen, ist die Amplitude dieser zweiten Phase des Signals größer als die Amplitude der ersten Phase (vgl. Abbildung 47). Insgesamt findet damit durch diesen anisotropen Einbau von Bacteriorhodopsin in die Lipidmembran ein Nettotransport von Protonen in das Vesikel statt. Hieraus resultiert der Aufbau einer elektrischen Potentialdifferenz und eine Protonenkonzentrationsdifferenz über die Membran. Um Effekte dieser Polarisation der Membran zu reduzieren, können zusätzlich geringe Mengen eines schnellen und unselektiven Ionenkanals in die Membran eingebaut werden. Die Ladungs- und Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Seiten der Membran bauen sich dann (dritte Phase des Indikatorsignals) durch eine Diffusion von Ionen durch diesen Kanal

schneller ab (④). Ohne den Zusatz eines Ionenkanals kann sich eine aufgebaute Protonenkonzentrationsdifferenz nur sehr langsam durch eine Diffusion der Protonen durch die Lipiddoppelschicht abbauen. In den hier dargestellten Messungen wurde zur Depolarisierung der Ionenkanal Gramicidin aus *Bazillus brevis* benutzt.

Die Versuche wurden an zwei Vesikelpräparationen nach gleicher Herstellung durchgeführt, die die internen Bezeichnungen DA13 und DA16 tragen. Die Hauptkomponente der Lipidphase stellte das DMPC dar. Zur Erzeugung einer negativen Oberflächenladung wurden die Lipide DMPA und PS in Anteilen von 10 % bis 60 % hinzugefügt. Zur Erzeugung einer positiven Oberflächenladung wurde auf das Lipidanalogon DMDAB zurückgegriffen, welches der Lipidphase in Anteilen von 10 % und 20 % zugesetzt wurde. Die Mischungen der Lipide wurden durch Lösen der Lipide in Chloroform und verdampfen des Lösungsmittels erzeugt. Durch Quellen dieser Mischungen in Wasser und Behandlung mit Ultraschall wurden die Vesikel zur Rekonstitution erzeugt. Das BR wurde mit Hilfe der „Freeze–Thaw“-Methode (vgl. Abschnitt 5.2.5.2) in die Membran der Vesikel rekonstituiert. Das Verhältnis von Lipid zu BR betrug 100 : 1 (m/m). Um eine schnelle Depolarisation der Vesikel nach dem Pumpvorgang zu gewährleisten, wurden die Vesikel vor der Messung mit einer methanolischen Gramicidin-Lösung versetzt, so daß sich im statistischen Mittel ein Gramicidin-Kanal pro 10 BR ausbilden konnte. Kontrollexperimente zeigten, daß eine solch hohe Konzentration an Gramicidin unter diesen Bedingungen nötig ist, um eine ausreichend schnelle Depolarisierung der Membran zu erreichen. Gleichzeitig wurde mit diesen Experimenten sichergestellt, daß Gramicidin keinen Einfluß auf den Photozyklus des Bacteriorhodopsins besitzt. Die Messung der Protonentranslokation in das wäßrige Medium wurde bei den drei KCl-Konzentrationen 15 mM, 150 mM und 1 M im neutralen pH-Bereich durchgeführt. Da DMPC eine Phasenumwandlungstemperatur von 23 °C besitzt und sich der Phasenzustand auf das Vorliegen von Bacteriorhodopsin im monomeren oder aggregierten Zustand auswirkt (Grzesiek & Dencher, 1988), wurden die Messungen bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Als optischer pH-Indikator wurde Pyranin in einer Konzentration von 25 µM zugesetzt. Die Anregungsenergie am Probenort betrug ca. 5 mJ bei einer Wellenlänge von 532 nm.

6.10.1 Kinetik des Photozyklus

In Abbildung 48 sind die transienten Absorptionsänderungen von Bacteriorhodopsin bei 412 nm (M-Intermediat) in verschiedenen Lipidumgebungen und im Vergleich zur nati-

ven Umgebung des Bacteriorhodopsins, der Purpurmembran dargestellt. Das Diagramm zeigt die Kinetik des M-Intermediats von Bacteriorhodopsin in neutraler Lipidumgebung (DMPC), in negativ geladener Lipiddoppelschicht (DMPC & PA bzw. PS) und in positiv geladener Lipidphase (DMPC & DMDAB). Wie zu erkennen ist, wird der Photozyklus durch den Ladungszustand dieser unterschiedlichen Lipidumgebungen beeinflusst. Die verschiedenen Lipidphasen unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrem Ladungszustand, sondern auch in der Struktur der Kopfgruppen der Lipide, der Kettenlänge der hydrophoben Reste und im Anteil ungesättigter Fettsäuren. Wie aus Abbildung 48 zu erkennen, ist allen rekonstituierten Bacteriorhodopsinvesikeln gemeinsam, daß der Aufbau des M-Intermediats schneller verläuft als in der nativen Purpurmembran, während der Zerfall des M-Intermediats verzögert ist. Um Effekte durch unterschiedliche Aggregatzustände der verschiedenen Lipidphasen auf den Photozyklus des Bacteriorhodopsins auszuschließen, wurden die in Abbildung 48 dargestellten transienten Absorptionsänderungen bei einer Temperatur von 30 °C aufgenommen, 7 °C oberhalb der Phasenumwandlung von DMPC. Das Bacteriorhodopsin liegt bei dieser Temperatur und dem verwendeten Lipid-BR-Verhältnis in monomerer Form in der Membran vor (*Grzesiek & Dencher, 1988; Dencher & Heyn, 1979*). Im Unterschied zur Purpurmembran bestehen bei diesem Aggregatzustand des Bacteriorhodopsins keine Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Proteinmoleküle sind vollständig von Lipiden umgeben.

Mathematisch läßt sich der Verlauf der transienten Absorptionsänderungen des Bacteriorhodopsins bei 412 nm in einer Lipidumgebung wie bei der Purpurmembran mit einer Summe aus fünf Exponentialtermen beschreiben. Die aus einer Anpassung erhaltenen Zeitkonstanten und relativen Amplituden sind in der Tabelle 24 auf Seite 183 im Anhang aufgeführt. Obwohl hier die Kinetik des Bacteriorhodopsins sowohl für die Purpurmembran als auch für die rekonstituierten Vesikel mit der gleichen Anzahl an Exponentialtermen angepaßt wurde, lassen sich die Daten nicht unmittelbar miteinander vergleichen: Beim Anpassen der M-Kinetik der Purpurmembran werden drei Terme benötigt, um den Aufbau des M-Intermediats zu beschreiben, und zwei für dessen Zerfall. Beim Bacteriorhodopsin in der Lipidumgebung sind hingegen nur zwei Exponentialterme zur Beschreibung des Aufbaus, aber drei zur Beschreibung des Zerfalls nötig. Einzig die Kinetik in einem Lipidgemisch aus 60 % DMPA und 40 % DMPC lieferte als Ergebnis eine Anpassung mit einer Verteilung der Exponentialterme auf Aufbau und Zerfall des M-Intermediats wie bei der Purpurmembran. Auch der Vergleich der Kinetik des Bacteriorhodopsins in den verschiedenen Lipidgemischen ist nicht ohne weiteres möglich, da sich die relativen Am-

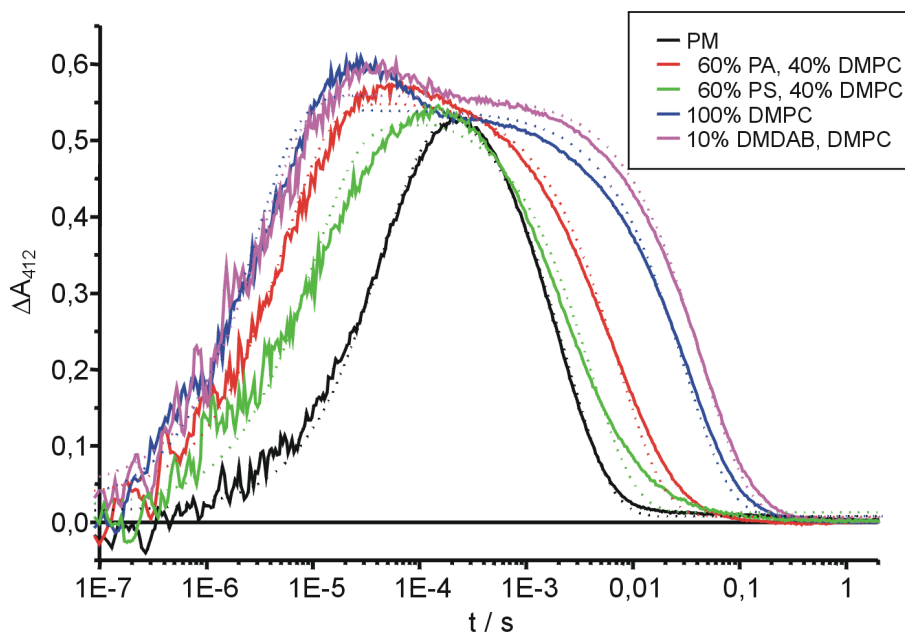


Abbildung 48: Transiente Absorptionsänderungen von BR bei 412 nm in unterschiedlich geladenen Lipidumgebungen (100 Lipide / BR) und in der nativen Purpurmembran bei 30°C, 150 mM KCl, pH 6,95. Die Signale sind auf eine gleiche Größe der aus der Anpassung erhaltenen Amplituden normiert. Die gepunkteten Linien geben die Anpassung der transienten Absorptionsänderungen mit je einem Exponentialterm für Aufbau und Zerfall wieder.

plituden der einzelnen Zeitkonstanten bei den unterschiedlichen Lipidgemischen zum Teil erheblich unterscheiden. Am wenigsten spekulativ ist ein Vergleich der Zeitkonstanten, wenn man davon ausgeht, daß die größte Zeitkonstante mit einer negativen Amplitude dem letzten Prozeß im Aufbau des M-Intermediats (dem L→M-Übergang) entspricht. Bei den Daten aus Tabelle 24 im Anhang ist dies die Zeitkonstante τ_{M3} für die Purpurmembran und τ_{M2} für die Proteoliposomen (Ausnahme: 60 % DMPA, 40 % DMPC). Die Amplituden dieser Prozesse liegen relativ dicht beieinander (PM: $A_{M3} = -67\%$, Proteoliposomen: $A_{M2} = 53\%$ bis 79%). In der Purpurmembran besitzt dieser Prozeß (τ_{M3}) eine Zeitkonstante von $74 \mu\text{s}$ und ist damit etwa um den Faktor 10 langsamer als τ_{M2} in den Lipidvesikeln. Ein Vergleich von τ_{M2} der Lipidvesikel untereinander zeigt, daß die Zeitkonstante in den Vesikeln mit einer Lipidphase aus 100 % DMPC mit $5,8 \mu\text{s}$ am kleinsten ist. Mit zunehmendem Anteil an DMDAB steigt die Zeitkonstante auf $12 \mu\text{s}$ bei 20 % DMDAB. Die Vesikel mit Anteilen von PS zeigen mit $\tau_{M2} \approx 7,5 \mu\text{s}$ keine Abhängigkeit der Zeitkonstanten von Dotierungsgrad und die Vesikel mit DMPA-Dotierung weisen unein-

heitliche Tendenzen bei Zeitkonstanten τ_{M2} von 7 μs bis 9 μs auf. Ein analoger Vergleich der Zeitkonstanten τ_{M2} der Purpurmembran mit τ_{M1} der Proteoliposomen weist für diesen Prozeß für die Purpurmembran mit 23 μs eine etwa um den Faktor 30 größere Zeitkonstante aus als für Proteoliposomen. Ein analoger Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für den Zerfall des M-Intermediats kann zwischen Purpurmembran und Proteoliposomen nicht getroffen werden: Bei der Purpurmembran wird der Zerfall des M-Intermediats im wesentlichen durch einen Prozeß bestimmt (τ_{M4} , $A_{M4} = 96\%$), während sich der Zerfall des M-Intermediats in den Vesikeln über drei Prozesse erstreckt.

	$\tau_{\text{MAufbau}} / \mu\text{s}$	$\tau_{\text{MZerfall}} / \text{ms}$
PM	43,4	2,4
60 % PS, 40 % DMPC	5,3	7,4
40 % PS, 60 % DMPC	3,6	10,9
20 % PS, 80 % DMPC	3,3	17,5
60 % DMPA, 40 % DMPC	10,8	3,9
40 % DMPA, 60 % DMPC	5,4	8,0
20 % DMPA, 80 % DMPC	3,3	17,9
100 % DMPC	2,8	30,7
10 % DMDAB, 90 % DMPC	3,3	44,8
20 % DMDAB, 80 % DMPC	2,7	48,9

Tabelle 10: Zeitkonstanten für den Aufbau und Zerfall des M-Intermediats von rekonstituierten Proteoliposomen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Lipidphase bei einer Anpassung von Aufbau und Zerfall mit je einem Exponentialterm (100 Lipide / BR, 30°C, 150 mM KCl, pH 6,95).

Ein qualitativer Vergleich der Geschwindigkeiten von Aufbau und Zerfall des M-Intermediats zwischen den verschiedenen Lipidgemischen und mit der Purpurmembran wird möglich, wenn man die transienten Absorptionsänderungen bei 412 nm mit nur zwei Exponentialtermen anpaßt: Einem für den Aufbau und einem für den Zerfall. Die Anpassung gibt den Verlauf der Kurve dann zwar nicht mehr exakt wieder, aber durch diese Reduktion können die Daten direkt miteinander verglichen werden. Die Werte, die sich aus einer solchen Anpassung ergeben sind in Tabelle 10 dargestellt, die Kurven, die einer solchen Anpassung entsprechen, sind in Abbildung 48 als punktierte Linien dargestellt.

Aus den Daten ist zu entnehmen, daß der Aufbau des M-Intermediats in einer reinen

DMPC-Umgebung am schnellsten verläuft und mit zunehmendem Anteil an negativ geladenem Lipid langsamer wird. Dieser Effekt ist beim DMPA stärker ausgeprägt als beim PS, was möglicherweise mit den unterschiedlichen Strukturen und Größen der Kopfgruppen erklärt werden kann. Wie in Abbildung 45 auf Seite 45 dargestellt tragen beide Lipide netto eine negative Ladung, bei dem PS setzt sich diese im Gegensatz zum DMPA aus einer positiven und zwei negativen Ladungen zusammen. Die Zeitkonstanten für die PS-dotierten Vesikel sind in etwa mit den Werten für die DMPA-dotierten Vesikel zu vergleichen, bei denen der DMPA-Anteil halb so groß ist wie der PS-Anteil. Die Vesikel mit Anteilen von DMDAB in der Lipidphase zeigen eine Geschwindigkeit des Aufbaus des M-Intermediats, die mit den reinen DMPC-Vesikeln vergleichbar ist. Diese Werte besitzen jedoch eine größere Unsicherheit, da die Vesikelsuspensionen mit einem DMDAB-Anteil sehr trübe sind und damit bei der Messung ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis ergeben.

Der Zerfall des M-Intermediats verläuft in allen Proteoliposomen langsamer als in der nativen Purpurmembran. Im Vergleich zur netto neutral geladenen Umgebung des DMPC beschleunigt ein zunehmender Anteil von negativ geladenen Lipiden in den Vesikeln den Zerfall des M-Intermediats. Auch hier ist der Einfluß von DMPA größer als der von PS. Die Zeitkonstante für den Zerfall des M-Intermediats in Vesikeln mit einem DMPA-Anteil von 60 % kommt mit 3,9 ms der Zeitkonstanten der Purpurmembran mit 2,4 ms schon sehr nahe. Der Einbau von DMDAB wirkt im Vergleich zum DMPC noch zusätzlich verlangsamend.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß sowohl der Aufbau als auch der Zerfall des M-Intermediats von Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen von der Oberflächenladungsdichte der Lipidphase beeinflusst wird. Während der Aufbau des M-Intermediats durch die Lipide beschleunigt wird, verlangsamt sich der Zerfall dieses Intermediats. Die größten Effekte werden dabei von einer positiven Oberflächenladung erzeugt. Erst bei einer sehr hohen negativen Oberflächenladungsdichte kommt der Photozyklus von Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen dem in der Purpurmembran nahe. Aus den Unterschieden in den Kinetiken zwischen den PS-dotierten und den DMPA-dotierten Vesikeln ist aber zu erkennen, daß die Ursachen für die Beeinflussung des Photozyklus nicht allein in elektrostatischen Wechselwirkungen zu suchen ist: PS und DMPA unterscheiden sich nicht in ihrer Ladung, wohl aber in der Struktur ihrer Kopfgruppen, in der Kettenlänge ihrer Fettsäuren und im Anteil ungesättigter Fettsäuren. Während das DMPA eine negative Ladung an

der Phosphatgruppe trägt, besitzt PS zwei negative Ladungen an der Phosphat- und der Carboxylatgruppe und eine positive Ladung an der Aminogruppe.

Qualitativ stimmen diese Ergebnisse mit Untersuchungen von *Heberle (1991)* überein, bei denen er ebenfalls den Photozyklus und die Protonentranslokation von Bacteriorhodopsin in Lipidvesikeln untersucht hatte. Eine Variation der Oberflächenladungsdichte der Lipidphase wurde in diesen Arbeiten durch den Zusatz von DMDAB (positive Ladung) und Phosphatidylglycerin (PG, negative Ladung) zum DMPC erreicht. Daten für die Kinetik des M-Intermediats werden in der Arbeit von *Heberle (1991)* nicht angegeben, aus den dargestellten transienten Absorptionsänderungen kann aber geschlossen werden, daß bei diesen Versuchen ebenfalls bei allen Lipidzusammensetzungen ein beschleunigter Aufbau des M-Intermediats gemessen wurde. Für den Zerfall des M-Intermediats wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine Verzögerung im Vergleich zur nativen Membran festgestellt. Diese Verzögerung des Zerfalls des M-Intermediats war bei DMDAB-Zusatz (positive Ladung) stärker ausgeprägt als bei PG-Zusatz (negative Ladung). Im Gegensatz zu dieser Abhängigkeit der Kinetik von der Oberflächenladung stellte *Heberle (1991)* bei der Dotierung der Vesikel mit dem netto neutralem Lipid Phosphatidylethanolamin (PE) ebenfalls eine Verzögerung des Zerfalls des M-Intermediats fest. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß neben der Ladung auch die Struktur der Lipide einen Einfluß auf den Photozyklus des Bacteriorhodopsins ausübt.

Kinetische Untersuchungen an rekonstituierten Proteoliposomen wurden ebenfalls von *Grzesiek & Dencher (1988)* durchgeführt. Bei der Anpassung von Aufbau und Zerfall des M-Intermediats mit je einem Exponentialterm wurden dabei für Vesikel mit einer Lipidphase aus 95 % DMPC und 5 % PS bei einer Temperatur von 28 °C Zeitkonstanten von $\tau_{\text{Aufbau}} < 6 \mu\text{s}$ und $\tau_{\text{Zerfall}} = 15,5 \text{ ms}$ festgestellt. Diese Werte stimmen gut mit den in Tabelle 10 aufgeführten Werten für Vesikel mit einem PS-Anteil von 20 % überein.

6.10.2 Protonenaustausch zwischen Membranoberfläche und wäßriger Phase

6.10.2.1 Abgabe der Protonen an das wäßrige Medium

In Abbildung 49 sind die Zeitkonstanten für den Übergang der Protonen von der Membranoberfläche in die wäßrige Phase bei 30 °C, 150 mM KCl und neutralem pH-Wert und die Zeitkonstanten für den Aufbau des M-Intermediats gegen die Membranzusammensetzung aufgetragen. Die Werte der Abszisse geben dabei den prozentualen Anteil der

geladenen Lipide bzw. -analoge in der Lipidphase wieder. Negative Werte beziehen sich dabei auf den Anteil der negativ geladenen Lipide, positive Werte auf den Anteil des positiv geladenen Lipidanalogs DMDAB. Die Werte, die aus den Messungen mit den verschiedenen Lipiden erhalten wurden, sind durch Symbole in unterschiedlicher Farbe markiert. Die folgenden Diagramme enthalten Werte, die aus zwei unabhängigen Meßreihen (interne Bezeichnung DA13 und DA16) an verschiedenen Proben gleicher Herstellungsvorschrift gewonnen wurden. Die Meßwerte aus den einzelnen Meßreihen sind jeweils durch quadratische bzw. dreieckige Symbole (Protonentranslokation) bzw. durch Kreise und Dreiecke (M-Kinetik) gekennzeichnet. Die Quadrate bezeichnen die Meßwerte der Meßreihe DA13, die Dreiecke die Meßwerte der Meßreihe DA16. Die einzelnen Zeitkonstanten der Protonentranslokation sind in der Tabelle 26 aufgeführt. Die Zeitkonstanten für das Erscheinen der Protonen in der wäßrigen Phase werden von der Geschwindigkeit der Protonenfreisetzung an der Oberfläche beeinflusst, die mit dem Aufbau des M-Intermediats gekoppelt ist. In dem Diagramm sind deshalb auch die Zeitkonstanten für den Aufbau des M-Intermediats aufgetragen, die aus der Anpassung der transienten Absorptionsänderungen mit einem Exponentialterm erhalten wurden.

Die in Abbildung 49 dargestellten Meßwerte zeigen zum Teil eine erhebliche Streuung. Dies ist wahrscheinlich auf unvermeidbare Variationen bei der Präparation der Vesikel zurückzuführen. Für das Pyraninsignal in den Vesikelsystemen wurden in den hier durchgeführten Versuchen Amplituden von 1 mOD bis 5 mOD gemessen. Diese, im Vergleich zu Messungen an der Purpurmembran sehr kleinen Indikatorsignale bedingen eine zusätzliche Unsicherheit bei der Datenauswertung. Es zeigte sich außerdem, daß die Kinetik des Photozyklus in Vesikeln sehr viel stärker vom pH-Wert beeinflusst wird als in der Purpurmembran. Selbst kleine Abweichungen des pH-Wertes zwischen der Messung mit Pyranin und der Referenzmessung beeinflussen den Photozyklus. Dieses schlägt sich in der Differenzbildung nieder und führt zu Fehlern im Indikatorsignal, da letzteres im Vergleich zum Photozyklussignal sehr klein ist. Vesikel, die in der Lipidphase DMDAB enthalten, weisen außerdem eine starke Trübung auf, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis gemindert wird. Bei einem DMDAB-Anteil von 20% ist die Trübung oft so stark, daß zwar einer Analyse der M-Kinetik möglich ist, eine Auswertung des Indikatorsignals aber nicht. Diese Vesikel neigen zusätzlich sehr stark zur Aggregation.

Die große Abweichung des einen Meßwertes für 100% DMPC (blaues Quadrat im oberen Bereich des Diagramms) ist dadurch zu erklären, daß die an dieser Probe gemessene

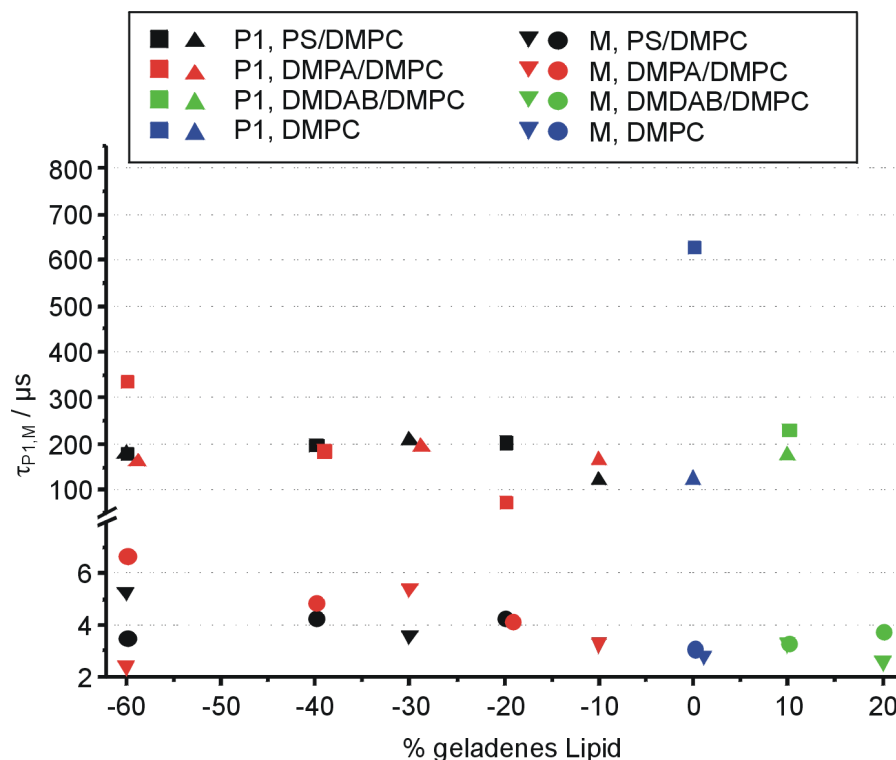


Abbildung 49: Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium (100 Lipide / BR, 150 mM KCl, 30°C, pH 6,9). Quadrate und Dreiecke bzw. Dreiecke und Kreise bezeichnen die Meßwerte aus zwei unabhängigen Meßreihen.

Kinetik des Übergangs der Protonen in die wäßrige Phase nur schlecht mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung angepaßt werden konnte. Möglicherweise hat bei dieser Probe eine Anlagerung des Pyranins an die netto neutrale Lipidphase stattgefunden, was dazu führt, daß eine biexponentielle Kinetik beobachtet wird. Dabei wäre eine schnellere Phase der Detektion der Protonen durch an die Membran angelagertes Pyranin zuzuordnen, während die langsamere Phase die Detektion der Protonen in der wäßrigen Phase beschreibt. Dieser Effekt wurde für die Probe auch bei der Messung der Protonentranslokation mit Pyranin bei Salzkonzentrationen von 15 mM KCl (Abbildung 49) und 1 M KCl (Abbildung 53) beobachtet.

Die Geschwindigkeit des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium ist bei den Vesikeln deutlich größer als bei der Purpurmembra. Während bei der Purpurmembra Zeitkonstanten τ_{P1} von etwa 600 bis 800 μs gemessen werden (Heberle,

1991; Grzesiek, 1986, Verclas, 1998; eigene Messungen, Abschnitt 6.6, Seite 90), liegen diese, zumindest bei den Vesikeln mit negativ geladenen Lipidanteilen, bei 150 bis 300 μs .

Aus den dargestellten Meßwerten ist zu erkennen, daß ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenladungsdichte der Membran und der Geschwindigkeit der Freisetzung der Protonen in das wäßrige Medium nicht besteht. Nur die ermittelten Zeitkonstanten für eine neutrale Lipidphase und die Werte für eine Lipidphase mit einem Anteil von 10 % DM-PA bzw. PS ($\tau_{P1} = 120 \mu\text{s}$ bis $160 \mu\text{s}$) sind etwas kleiner als die übrigen Meßwerte (um $200 \mu\text{s}$). Aufgrund der Streuung der Meßwerte kann daraus nicht geschlossen werden, daß es sich hierbei tatsächlich um einen Einfluß der Lipidphase handelt.

Der bei den Vesikeln gemessene Übergang der Protonen von der Membranoberfläche in die wäßrige Phase ist mit etwa $200 \mu\text{s}$ um einiges schneller als dieser Prozeß an der nativen Purpurmembra mit $800 \mu\text{s}$. Der Aufbau des M-Intermediats und der damit gekoppelte Pumpprozeß verläuft bei den Vesikeln mit $2 \mu\text{s}$ bis $11 \mu\text{s}$ (Tabelle 10) ebenfalls schneller als bei der nativen Purpurmembra mit $43 \mu\text{s}$. Der Unterschied von $600 \mu\text{s}$ in den Zeitkonstanten für die Abgabe der Protonen an die wäßrige Phase zwischen Vesikel und nativer Purpurmembra ist aus den Differenzen der Zeitkonstanten des M-Aufbaus aber nicht zu erklären.

Die dargestellten Ergebnisse für den Transfer der Protonen von der Membranoberfläche in die wäßrige Phase stehen im Einklang mit Messungen von Heberle (1991) an rekonstituierten Proteoliposomen unterschiedlicher Zusammensetzung bei 5°C . In der Arbeit von Heberle (1991) werden jedoch keine konkreten Zahlenwerte für die Zeitkonstanten der Protonentranslokation angegeben. Aus einer grafischen Darstellung dieser Werte ist zu entnehmen, daß auch bei den Untersuchungen von Heberle (1991) für die Geschwindigkeit des Protonenübergangs in die wäßrige Phase keine Abhängigkeit vom Ladungszustand gefunden wurde. Bestätigt wird in diesen Messungen aber auch, daß die Abgabe der Protonen an das wäßrige Medium bei Vesikeln schneller verläuft als an der Purpurmembra.

6.10.2.2 Temperaturabhängigkeit der Protonenabgabe ins das wäßrige Medium

Die in Abbildung 50 dargestellte Temperaturabhängigkeit der Abgabe der Protonen in die wäßrige Phase zeigt einen deutlichen Einfluß der Zusammensetzung der Lipidphase auf

die Kinetik der Protonenfreisetzung in die wäßrige Phase. Zum Vergleich ist die temperaturabhängige Kinetik der Protonenfreisetzung nativer Purpurmembra in das Diagramm aufgenommen worden (schwarze Linie). Die Protonenfreisetzung ist bei den Vesikeln mit dem positiv geladenen Lipidanalogen DMDAB sehr viel stärker temperaturabhängig als bei den Vesikeln mit hohem Anteil negativ geladener Lipidkomponenten. Das führt dazu, daß der Transfer der Protonen ins wäßrige Medium bei diesen Vesikeln unterhalb einer Temperatur von 5 °C langsamer ist als bei allen anderen untersuchten Proteoliposomen und auch langsamer als bei der Purpurmembra. Bei Temperaturen oberhalb von 30 °C läuft die Protonenfreisetzung an diesen Vesikeln am schnellsten ab. Weiterhin zeigt das Arrhenius-Diagramm, daß alle Geschwindigkeitskonstanten bei einer Temperatur von 30 °C sehr dicht beieinander liegen, während die Unterschiede bei höheren und niedrigeren Temperaturen sehr viel größer sind.

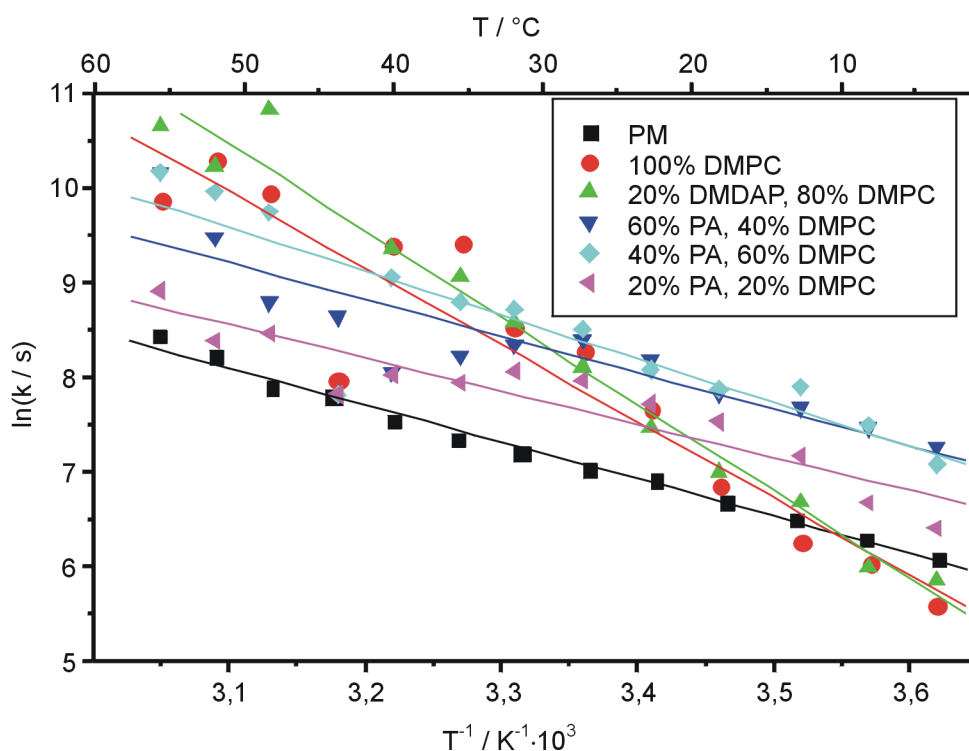


Abbildung 50: Arrhenius-Diagramm der Geschwindigkeitskonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium, detektiert mit Pyranin (100 Lipide / BR, 150 mM KCl, pH 6,9).

Lipide zeigen bei einer definierten Temperatur einen Phasenübergang zwischen flüssigkristallinem Zustand und Gelzustand. Die Phasenübergangstemperatur liegt für DMPC bei

23 °C. Bacteriorhodopsin, das in eine Lipiddoppelschicht eingebettet ist, zeigt bei einer Temperatur von etwa 8 °C unterhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids ebenfalls einen Phasenübergang (*Grzesiek & Dencher, 1988*): Unterhalb dieser Temperatur liegt es in der Membran in Form von Aggregaten vor, oberhalb dieser Temperatur in monomerer Form. Die aus Abbildung 50 erkennbare kontinuierliche Veränderung der Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche in die wässrige Phase zeigt, daß dieser Wechsel des Aggregatzustandes des Bacteriorhodopsins kein Einfluß auf die Kinetik des Protonentransfers besitzt. Andernfalls würde man in dem dargestellten Graphen bei der Phasenübergangstemperatur Sprünge in den Geschwindigkeitskonstanten oder Änderungen der Steigung der Geraden erwarten.

Die aus der Temperaturabhängigkeit des Protonentransfers in die wässrige Phase gewonnenen und in Tabelle 11 aufgeführten Aktivierungsenergien zeigen, daß eine deutliche Abhängigkeit der Aktivierungsenergie von der Oberflächenladungsdichte der Lipidphase besteht. Die höchste Aktivierungsenergie mit $76,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ besitzen Vesikel mit einer Lipidphase aus 20 % DMDAB und 80 % DMPC. Mit zunehmendem Anteil negativ geladener Lipidkomponenten sinkt die Aktivierungsenergie und erreicht bei einer Zusammensetzung von 60 % DMPA und 40 % DMPC einen Wert von $32,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, der im Rahmen der Genauigkeit dieser Messungen der Aktivierungsenergie für die Protonenfreisetzung an der Purpurmbran entspricht. Wie schon bei der Kinetik des M-Intermediats beobachtet, ist der Einfluß von DMPA auf die Aktivierungsenergie größer als der Einfluß von PS.

6.10.2.3 Wiederaufnahme der Protonen aus dem wässrigen Medium

Die in Abbildung 51 aufgetragenen Zeitkonstanten für den zweiten Schritt im Protonenaustausch zwischen Membranoberfläche und wässriger Phase können der Wiederaufnahme der Protonen aus dem wässrigen Medium von der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins zugeordnet werden. Wie beim Transfer der Protonen in die wässrige Phase in Abbildung 49 sind auch in der Abbildung 51 die Meßwerte aus zwei Versuchsreihen aufgetragen und durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Werte in der Tabelle 26 auf Seite 185 aufgetragen. Wie schon im Abschnitt 6.7.3 diskutiert, besteht ein Zusammenhang zwischen dem Zerfall des M-Intermediats und der Wiederaufnahme der Protonen durch das Bacteriorhodopsin. Die aus einer Anpassung mit einem Exponentialterm ermittelten Zeitkonstanten für den M-Zerfall sind daher ebenfalls in der Abbildung mit aufgetragen (Rauten und Sterne).

	$E_{aP1} / \text{kJ mol}^{-1}$
PM	32,5
60 % PS, 40 % DMPC	38,2
40 % PS, 60 % DMPC	50,3
20 % PS, 80 % DMPC	37,5
60 % DMPA, 40 % DMPC	32,1
40 % DMPA, 60 % DMPC	42,9
20 % DMPA, 80 % DMPC	51,3
100 % DMPC	71,7
20 % DMDAB, 80 % DMPC	76,2

Tabelle 11: Aktivierungsenergien des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium (100 Lipide / BR, 150 mM KCl, pH 6,9).

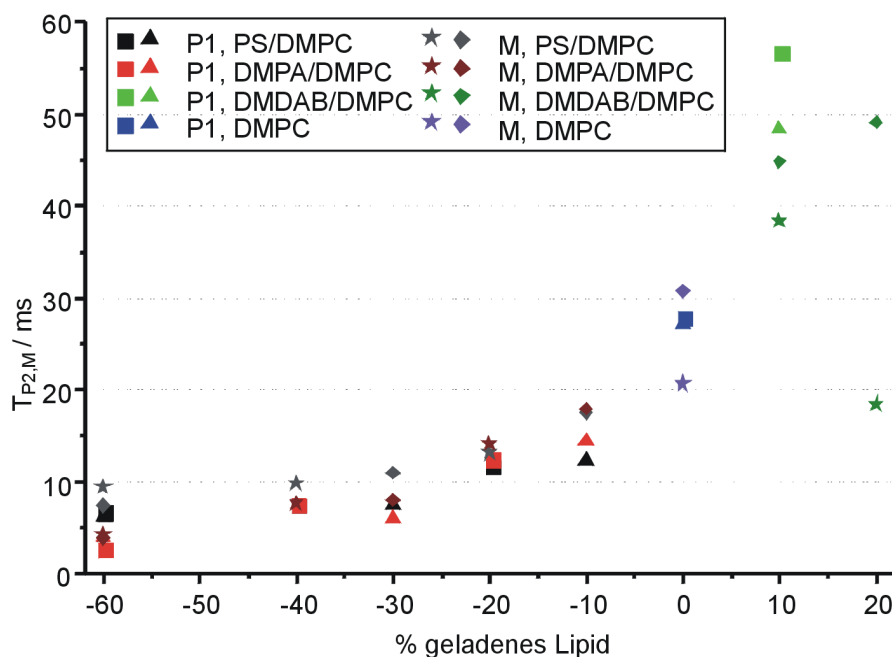


Abbildung 51: Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen vom wäßrigen Medium zur Membranoberfläche. (100 Lipide / BR, 150 mM KCl, 30°C, pH 6,9)

Sowohl der Zerfall des M-Intermediats als auch die Wiederaufnahme der Protonen werden vom Ladungszustand der Lipidumgebung beeinflusst und sind in den Vesikeln langsamer als bei der Purpurmembra. Aus der Abbildung 51 ist deutlich zu erkennen, daß eine

enge Kopplung zwischen dem Zerfall des M-Intermediats und der Wiederaufnahme der Protonen aus der wäßrigen Phase besteht. Die Vesikel mit einer negativen Oberflächenladung zeigen beim Zerfall des M-Intermediats und bei der Wiederaufnahme von Protonen gleiche Zeitkonstanten. Für die Vesikel mit einem Anteil von 10 % DMDAB liegen die Zeitkonstanten des M-Zerfalls etwas unter denen für die Wiederaufnahme der Protonen. Für die Vesikel mit einem DMDAB-Anteil von 20 % konnten die Indikatorsignale leider nicht isoliert werden. Wie schon in Abschnitt 6.7.3 diskutiert ist die Wiederaufnahme der Protonen von der zytoplasmatischen Seite des Bacteriorhodopsins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im letzten Teil des Photozyklus, woraus sich die Korrelation von Protonenaufnahme und Zerfall des M-Intermediats erklären läßt.

Die Wiederaufnahme der Protonen verläuft bei den Vesikeln mit der größten negativen Oberflächenladungsdichte am schnellsten und kommt mit Zeitkonstanten von $\tau_{P2} = 2,7$ ms bis 6,7 ms bei den Vesikeln mit einem Anteil negativ geladener Lipide von 60 % den Zeitkonstanten für die Purpurmembran (6,7 ms, Tabelle 3 auf Seite 91) am nächsten. Die Zeitkonstanten nehmen mit abnehmend negativer Ladung der Membran geringfügig zu und erreichen für Vesikel mit einem Anteil negativ geladener Lipide von 10 % Werte von $\tau_{P2} = 12,5$ ms bis 14,5 ms. Für die Vesikel mit einer netto neutralen Lipidphase steigen die Zeitkonstanten stark an auf Werte von $\tau_{P2} = 27,2$ ms bis 27,9 ms und erreichen schließlich für Vesikel mit einem DMDAB-Anteil von 10 % Werte von $\tau_{P2} = 48,3$ ms und 56,7 ms. Dieses entspricht etwa dem 10 bis 20fachen Wert der Vesikel mit 60 % negativ geladenem Lipid. Im Unterschied zum Zerfall des M-Intermediats wurde bei der Geschwindigkeit der Protonenwiederaufnahme kein signifikanter Unterschied zwischen den Lipiden PS und DMPA gefunden. Der Effekt scheint demnach von der Art des negativ geladenen Lipids unabhängig zu sein und nur von der Konzentration geladener Lipide in der Lipidphase und damit von der Oberflächenladungsdichte abzuhängen.

6.10.3 Ionenstärkeabhängigkeit des Protonentransfers

Wenn der mit Pyranin gemessene Protonentransfer von der Membranoberfläche in das wäßrige Medium von der Ladung der Lipide beeinflusst wird, ist zu erwarten, daß die Ionenstärke der Lösung ebenfalls einen Einfluß auf die Kinetik des Austausches hat. In wäßriger Lösung sind elektrische Ladungen immer von einer Wolke aus Gegenionen umgeben. Das elektrische Feld, das von den Ladungen an der Membran erzeugt wird, bewirkt

das Entstehen einer elektrischen Doppelschicht, deren Reichweite in die Lösung mit der Debye-Länge l_D (Gleichung 5, Seite 10) beschrieben werden kann. Die Debye-Länge ist umgekehrt proportional zur Wurzel der Ionenstärke. Die Verringerung der Salzkonzentration auf ein Zehntel bewirkt damit ein Anwachsen der Debye-Länge etwa um den Faktor drei. Für die drei untersuchten Salzkonzentrationen von 15 mM KCl, 150 mM KCl und 1 M KCl ergeben sich Debye-Längen von $l_D = 2,5$ nm, 0,8 nm und 0,3 nm (vgl. Abschnitt 3.3, Seite 9 f.). Diese unterschiedlichen Dimensionen der Doppelschicht sollten Auswirkungen auf die Kinetik der Protonentranslokation besitzen.

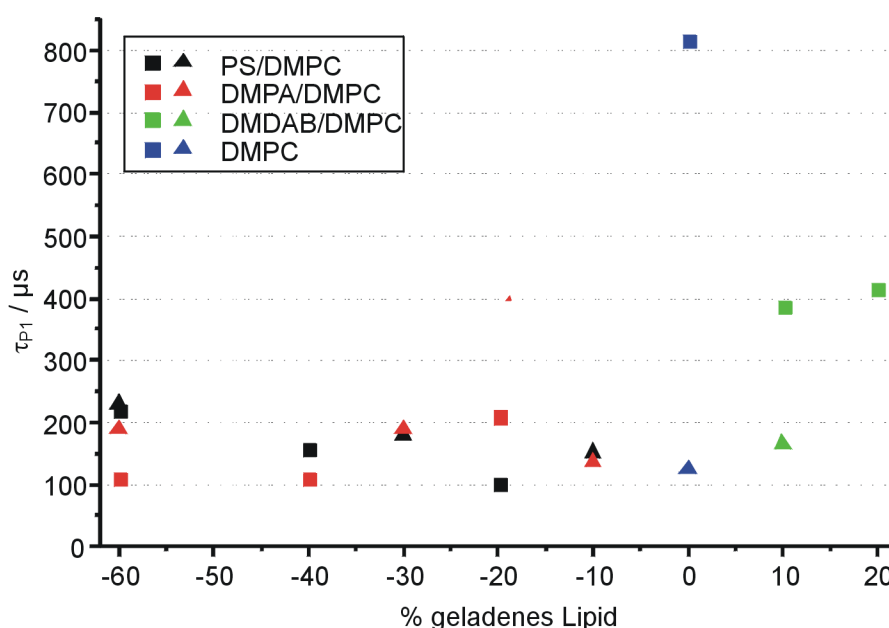


Abbildung 52: Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium. (100 Lipide / BR, 15 mM KCl, 30°C, pH 6,9)

Die in den Abbildungen 52 und 53 aufgetragenen Zeitkonstanten für den Übergang der Protonen von der Membranoberfläche in das wäßrige Medium bei Salzkonzentrationen von 15 mM KCl und 1 M KCl streuen stärker als die bei einer Salzkonzentration von 150 mM ermittelten Werte (Abbildung 52 auf Seite 150). Dieses ist darauf zurückzuführen, daß es bei hohen und bei niedrigen Salzkonzentrationen schwieriger ist, bei beiden Messungen die zur Gewinnung des Indikatorsignals nötig sind, identische pH-Werte einzustellen. Die Daten zeigen aber, daß auch bei diesen Salzkonzentrationen die Kinetik des Protonentransfers in die wäßrige Phase von der Ladung der Lipide nicht beeinflusst wird. Die Zeitkonstanten liegen mit Ausnahme einiger Ausreißer alle im Bereich zwischen 100 μ s bis 200 μ s und zeigen somit keine signifikanten Abweichungen zu den zuvor dargestellten

Daten bei einer Salzkonzentration von 150 mM KCl (Abbildung 49). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es kein Zusammenhang zwischen der Oberflächenladungsdichte der Proteoliposomen und der Kinetik der Freisetzung der Protonen in die wäßrige Phase gibt. Eine Auswirkung der Salzkonzentration auf den Transfermechanismus für Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium kann aus den gewonnenen Daten nicht erkannt werden.

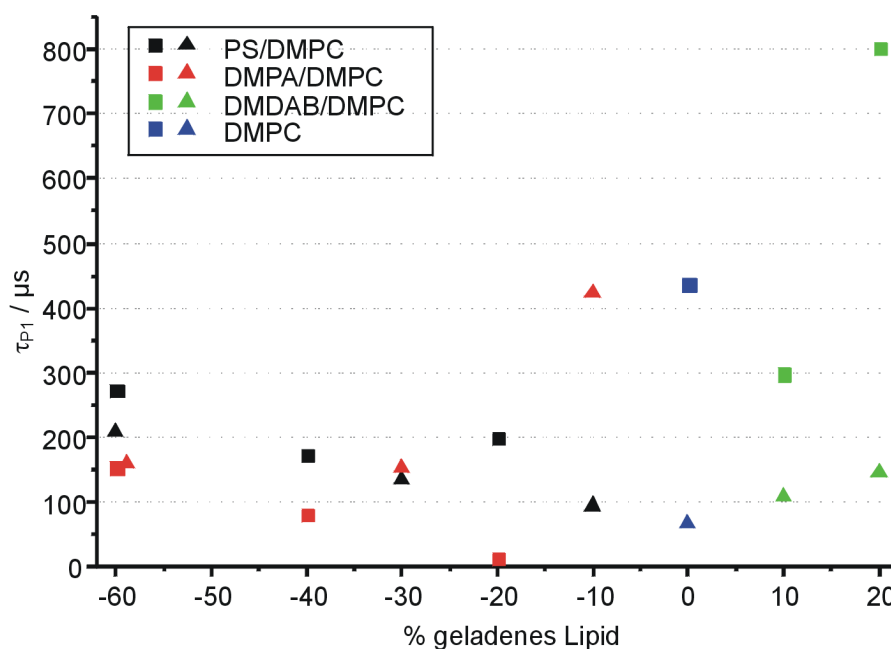


Abbildung 53: Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wäßrige Medium. (100 Lipide / BR, 1 M KCl, 30°C, pH 6,9)

Für die in Abbildung 54 und 55 dargestellten Zeitkonstanten für die Wiederaufnahme der Protonen aus der wäßrigen Phase bei Salzkonzentrationen von 15 mM KCl und 1 M KCl zeigt sich, daß auch bei der Wiederaufnahme der Protonen aus der wäßrigen Phase kein signifikanter Einfluß der Ionenstärke auf die Zeitkonstanten besteht. Auch hier streuen die Werte stärker als die bei einer Salzkonzentration von 150 mM KCl ermittelten (Abbildung 51). Die Diagramme bestätigen aber die Beobachtung, daß die Wiederaufnahme der Protonen bei der größten negativen Oberflächenladungsdichte am schnellsten verläuft. Mit Abnahme der negativen Ladungsdichte steigt auch bei diesen Salzkonzentrationen die Zeitkonstante zunächst langsam und bei neutraler und positiv geladener Lipidoberfläche stark an. Die ermittelten Zeitkonstanten für die Proben mit Salzkonzentrationen von 15 mM und 1 M KCl liegen im Bereich der für eine Salzkonzentration von 150 mM ermittelten Werte.

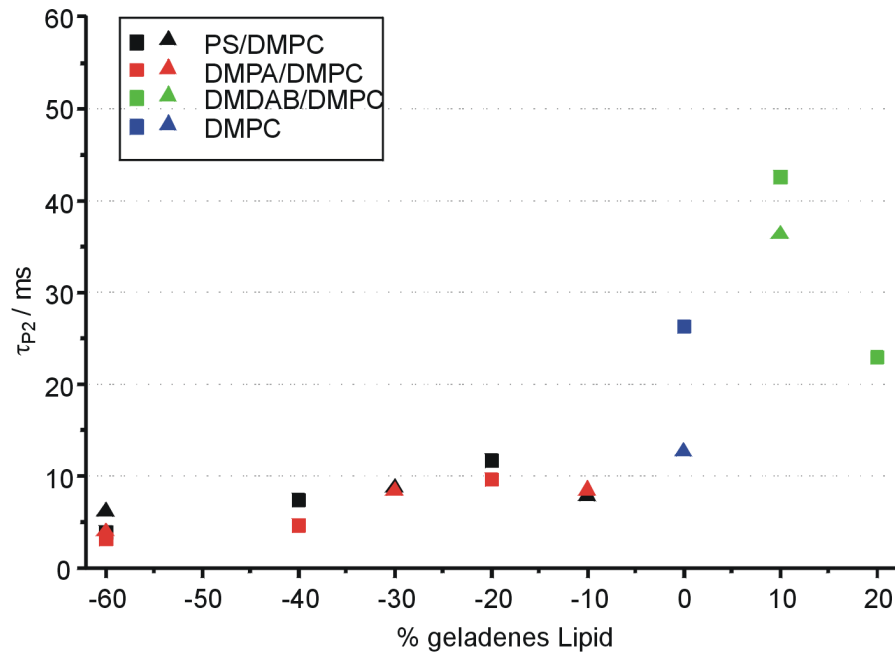


Abbildung 54: Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wässrige Medium. (100 Lipide / BR, 15 mM KCl, 30°C, pH 6,9)

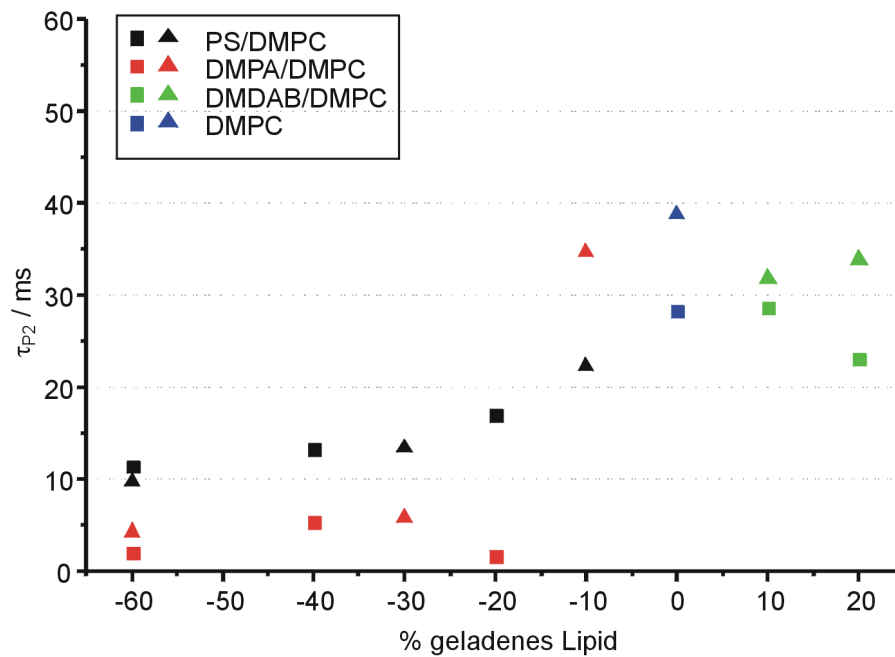


Abbildung 55: Zeitkonstanten des Übergangs der Protonen von der Membranoberfläche ins wässrige Medium. (100 Lipide / BR, 1 M KCl, 30°C, pH 6,9)

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Kinetik der Wiederaufnahme von Protonen aus dem wäßrigen Medium in der zweiten Hälfte des Photozyklus von Bacteriorhodopsin deutlich von der Oberflächenladungsdichte der Lipidphase in einem rekonstituierten System abhängt. Andererseits konnte trotz teilweise erheblicher Streuung der ermittelten Meßwerte für die Kinetik der Protonenfreisetzung in die wäßrige Phase gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenladungsdichte der Membran und der Kinetik des Protonentransfers in die wäßrige Phase nicht besteht. Auch die Tatsache, daß die Kinetik des Protonentransfers in die wäßrige Phase von der Ionenstärke der Lösung nicht beeinflußt wird, unterstützt diesen Befund.

Möglicherweise ist die Reichweite des elektrischen Feldes der Ladung der Lipide unter diesen Bedingungen zu gering, um einen direkten Einfluß auf die Oberfläche des Bacteriorhodopsins zu haben. Wie in Abbildung 3 auf Seite 14 dargestellt, besitzt die Elementarzelle von Bacteriorhodopsin in der Purpurmembran eine Kantenlänge von 6,2 nm. Die Oberfläche eines Bacteriorhodopsin-Moleküls besitzt demnach eine Ausdehnung von etwa 2,5 nm · 4 nm. Der Mittelpunkt dieser Oberfläche, in dem sich die Öffnung des Kanals befindet, ist also mehr als 1 nm vom Rand des Proteins und damit von der Lipidphase entfernt. Diese Entfernung ist aber schon größer als die für eine Konzentration von 150 mM KCl berechnete Debye-Länge von 0,8 nm. Aber auch bei einer Salzkonzentration von 15 mM KCl, bei der die Debye-Länge 2,5 nm beträgt, wurde ein Einfluß der Oberflächenladungsdichte auf die Kinetik der Protonentranslokation nicht beobachtet.

6.10.4 Fluoreszenztitrationen an Proteoliposomen

Aus der Gouy-Chapman-Theorie geht hervor, daß an geladenen Membranen für Ionen Konzentrationsunterschiede zwischen der Membranoberfläche und der wäßrigen Phase bestehen. Die Konzentration positiv geladener Ionen wie der Protonen ist dabei an der Oberfläche einer negativ geladenen Membran größer als in der wäßrigen Phase in einiger Entfernung zur Membran. Die Unterschiede dieser Konzentrationen hängen dabei von der Oberflächenladungsdichte der Membran ab. Ein pH-Indikator, der in ein solches Membransystem eingeführt wird, zeigt daher an der Membranoberfläche einen niedrigeren pH-Wert an als in der Lösung. Mißt man andererseits den pH-Wert in der Lösung in einem Abstand von der Membran und korreliert diesen mit den Absorptionseigenschaften

des Indikators an der Membranoberfläche, so ergibt sich ein apparenter pK-Wert des Indikators an der Oberfläche, dessen Wert von der Oberflächenladungsdichte der Membran abhängt.

Rekonstituiert man Bacteriorhodopsin mit kovalent gebundenem pH-Indikator in Lipidmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung, sollte der gemessene apparente pK-Wert des Indikators von der Ladungsdichte der Lipidphase abhängen. Dieser Zusammenhang gilt nur, wenn die Lipidphase nicht soweit von dem Indikator entfernt ist, daß die Ladungen der Lipide von Gegenionen in der Lösung abgeschirmt werden können.

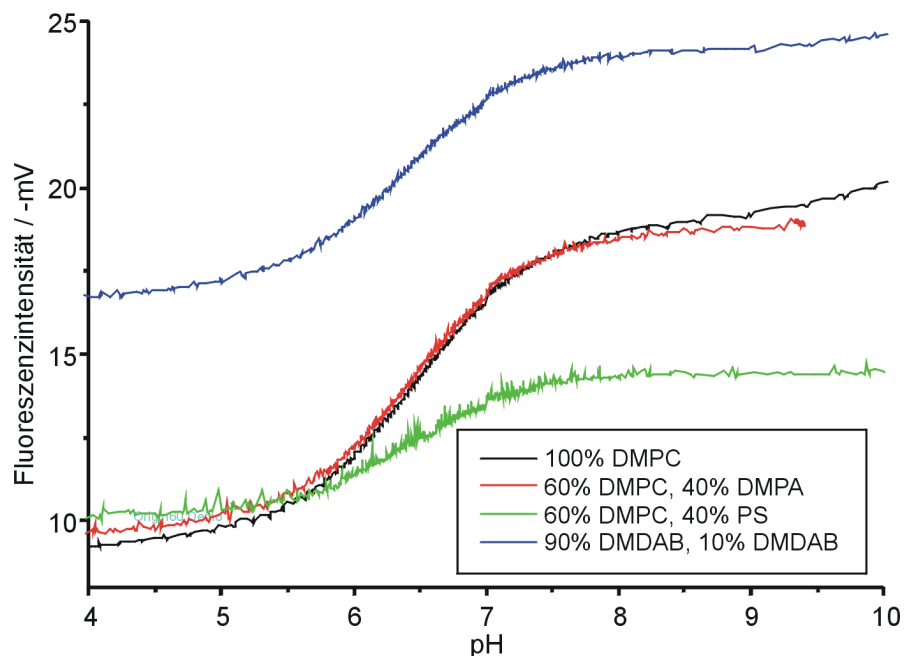


Abbildung 56: Titrationskurven rekonstituierten Proteoliposomen mit Fluorescein-markiertem Bacteriorhodopsin (100 Lipide / BR, 30°C, 150 mM KCl).

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob sich die Ladungsdichte der Lipidphase im pK-Wert des Bacteriorhodopsin-gebundenen Indikators widerspiegelt, wurden Fluoreszenztitrations durchgeföhrt, bei denen die Bacteriorhodopsin vor der Rekonstitution an der Aminosäure K129 auf der extrazellulären Seite des Proteins mit Fluorescein markierte wurde. Dieses markierte Bacteriorhodopsin wurde in Lipidvesikel rekonstituiert, welche die gleiche Zusammensetzung besitzen wie in den vorangegangenen Kapitel beschrieben (60 % DMPA bzw. 60 % PS mit 40 % DMPC bis 10 % DMDAB mit 90 % DMPC). Die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer Salzkonzentration

von 150 mM KCl wurde dabei mit zwei Methoden untersucht. Zum einen wurden in den Lösungen der rekonstituierten Proteoliposomen nacheinander unterschiedliche pH-Werte eingestellt und die Fluoreszenzintensität bei Raumtemperatur jeweils in einem kommerziellen Fluoreszenzspektrometer (LS-50B, Perkin Elmar) bestimmt. Zum anderen wurden die Lösungen nach der in Abschnitt 5.3.6 beschriebenen Methode mit einer kontinuierlichen Fluoreszenztitration im Blitzlichtspektrometer bei 30 °C untersucht. Dabei wurde der pH-Wert der Lösung zunächst auf einen Wert von etwa pH 4 eingestellt und dieser dann durch schrittweise Zugabe von 50 mM Natriumhydroxid-Lösung aus einem Titrator bis zu einem pH-Wert von pH 10 gesteigert. Währenddessen wurden simultan pH-Wert und Fluoreszenzintensität der Lösung aufgezeichnet. Abbildung 56 zeigt exemplarisch vier der so gewonnenen Meßkurven. Aufgetragen ist die Ausgangsspannung des Photomultipliers, die einer relativen Fluoreszenzintensität entspricht, gegen den pH-Wert. Aus den dargestellten Kurven und den Meßwerten der Einzelmessungen lassen sich nach Gleichung 11 die pK-Werte des an das Bacteriorhodopsin gebundenen Indikators Fluorescein bestimmt.

Die aus den kontinuierlichen Titrationsen ermittelten pK-Werte in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidphase sind in Abbildung 57 als Dreiecke dargestellt, die aus den Einzelmessungen ermittelten Werte als Quadrate. Die nach beiden Verfahren ermittelten pK-Werte weichen bei gleicher Zusammensetzung der Vesikel stark voneinander ab. Diese Abweichungen sind daraus zu erklären, daß die Einzelmessungen in dem kommerziellen Fluoreszenzspektrometer bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, während die Proben bei der kontinuierlichen Titration im Blitzlichtspektrometer auf eine Temperatur von 30 °C temperiert waren.

Die pK-Werte aus den kontinuierlichen Titrationsen (Dreiecke) weisen unter Berücksichtigung der Fehlergröße keine Tendenz der Abhängigkeit des pK-Wertes von der Zusammensetzung der Lipidphase auf.

Lediglich die aus den Einzelmessungen bestimmten pK-Werte fallen mit zunehmendem Anteil an DMPA leicht ab. Dieser beobachtete Abfall des apparente pK-Werts widerspricht jedoch der Gouy-Chapman-Theorie, nach welcher der apparenten pK-Wert eines Indikators mit zunehmend negativer Oberflächenladungsdichte ansteigen müßte. Bei der Tendenz dieser Meßwerte muß es sich daher um Meßfehler handeln.

Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß ein pH-Indikator auf der Oberfläche des Bacteriorhodopsins unter diesen Bedingungen nur das lokale elektrische Feld des Proteins

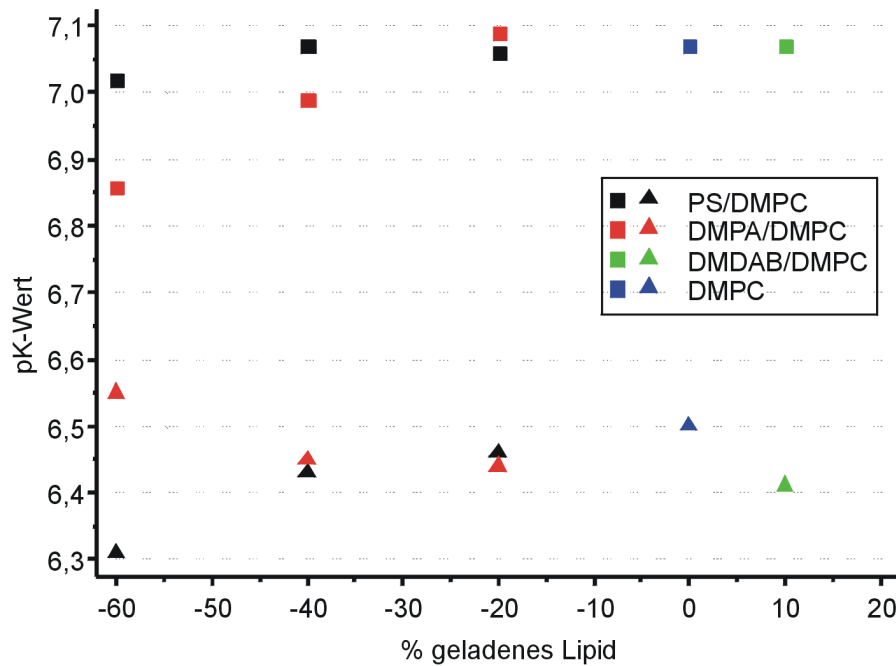


Abbildung 57: Aus den Titrations bestimmten pK -Werte der rekonstituierten Proteoliposomen mit Fluorescein-markiertem Bacteriorhodopsin. (150 mM KCl)

„sieht“ (Nachliel *et al.*, 1996), während die Lipide so weit von der Oberfläche entfernt sind, daß deren Ladungen von den Gegenionen in der Lösung abgeschirmt werden und keinen Einfluß auf den Indikator an der Proteinoberfläche ausüben können. Somit unterstützen die Ergebnisse der Fluoreszenztitrations die Überlegungen zur Ladungs- und Ionenstärkeabhängigkeit des Protonentransfers in Vesikeln (vgl. Abschnitt 6.10.3).

6.11 Protonentranslokation vom Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase in Vesikeln

Von *Middendorf (1996)* wurden Verfahren etabliert, mit denen die Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat selektiv mit reaktiven Derivaten des pH-Indikators Fluorescein markiert werden kann. Außerdem wurden in dieser Arbeit Methoden getestet, mit denen es möglich ist, Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase gemeinsam in Lipidvesikel zu rekonstituieren. Ziel war es, ein System aufzubauen, an dem der Protonentransfer von der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin zu dem Protonenverbraucher ATP-Synthase mit Hilfe der Blitzlichtspektroskopie untersucht werden kann. Leider ist es bisher nicht gelungen, Absorptionsänderungen des Indikators an der ATP-Synthase nach Lichtanregung des Bacteriorhodopsins in dem System zeitaufgelöst zu detektieren. In diesem Abschnitt sollen die Kriterien des Systems diskutiert werden, die für die Meßbarkeit eines Indikatorsignals verantwortlich sind. Außerdem sollen Ansatzpunkte aufgezeigt werden, wie die Eigenschaften der rekonstituierten Proteoliposomen hinsichtlich einer Meßbarkeit der Protonentranslokation verbessert werden können.

Für die Detektierbarkeit eines Indikatorsignals an rekonstituierten Proteoliposomen mit Bacteriorhodopsin und markierter ATP-Synthase sind hauptsächlich vier Faktoren verantwortlich:

- Die Lichtstreuung der Vesikel
- Die Anzahl der gepumpten Protonen
- Die Konzentration und Empfindlichkeit des Indikators
- Die Pufferkapazität des Systems

Die optische Dichte der Vesikelsuspension limitiert die wählbare Konzentrationen an Proteoliposomen in der Lösung: Je weniger Licht auf den Detektor des Spektrometers fällt, desto verrauschter sind die erhaltenen Signale. In der praktischen Durchführung der Messungen kann mit Proben gearbeitet werden, deren optische Dichte 1,5 OD nicht übersteigt. Bei Vesikelsystemen setzt sich die optische Dichte der Probe aus zwei Komponenten zusammen: Aus der Lichtstreuung der Vesikel und aus den Absorptionen von Bacteriorhodopsin und Fluorescein. Die Absorptionen dieser beiden Komponenten können als aktive

Anteile der optischen Dichte bezeichnet werden. Die Absorption des Bacteriorhodopsins ist nötig für das Pumpen der Protonen und die Absorption des Fluoresceins ist der Anteil, dessen Änderung man messen möchte, um die lokale Änderung des pH-Wertes zu bestimmen. Die Streuung der Vesikel bleibt während der Messung konstant und vermindert somit nur das Signal-Rausch-Verhältnis. Die Lichtstreuung von Vesikeln hängt zum einen von Art der Lipide (Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen) und zum anderen von der Größe der Vesikel ab.

Die Anzahl der gepumpten Protonen wird beeinflusst von der Konzentration und der relativen Aktivität des Bacteriorhodopsins in der Probe, der Energie des Anregungsblitzes und von der Orientierung des Bacteriorhodopsins in der Membran.

Die Lichtstreuung der Vesikel ist bei der Messung der limitierende Faktor für die Konzentration an Proteoliposomen in der Probe. Die Konzentration des Bacteriorhodopsins in der Probe läßt sich steigern, indem entweder mehr Bacteriorhodopsin in die einzelnen Liposomen rekonstituiert wird oder die Lichtstreuung der Proteoliposomen verringert wird. Dies kann durch eine Variation der Lipidzusammensetzung oder durch Erzeugung kleiner Vesikel erreicht werden. Zur Messung kann dann eine höhere Konzentration an Liposomen eingesetzt werden. Die üblicherweise zur Messung der Protonentranslokation eingestellte Energie des Anregungsblitzes ist schon so groß, daß 10 % bis 20 % der Bacteriorhodopsin-Moleküle angeregt werden. Aufgrund der Eigenschaften des Photozyklus läßt sich dieser Anteil nur bis etwa 35 % steigern (Abschnitt 6.5.1, Seite 81 *f.*). Für einen gerichteten Einbau des Bacteriorhodopsins in die Lipidmembran sind bisher keine Methoden bekannt.

Die Konzentration und die Empfindlichkeit des pH-Indikators bestimmen die Größe des Signals, das aus einer Änderung des pH-Wertes resultiert. Fluorescein besitzt mit einem Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{490} = 69200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei alkalischem pH-Wert und einer maximalen pH-Sensitivität von $20400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{pH}^{-1}$ sehr hohe Werte, die von anderen Indikatoren kaum übertroffen werden. Die Größe des Indikatorsignals kann daher nur durch eine Erhöhung der Konzentration des Fluoresceins in der Probe gesteigert werden. Die Konzentration von Fluorescein in der Probe hängt dabei von der Anzahl der pro Liposom eingebauten ATP-Synthasen, vom Markierungsgrad der ATP-Synthase und wie im letzten Absatz beschrieben von der Lichtstreuung der Lipidvesikel ab.

Die Pufferkapazität des Systems wird von den Konzentrationen der ATP-Synthase und des Bacteriorhodopsins sowie von Art und Menge des Lipids im System bestimmt. Da das

Indikatorsignal mit zunehmender Pufferkapazität kleiner wird, ist eine möglichst geringe Pufferkapazität des Gesamtsystems vorteilhaft für die Messung der Protonentranslokation.

Insgesamt wäre für die Messung der Protonentranslokation ein Vesikelsystem günstig, bei dem sich möglichst viel gerichtetes Bacteriorhodopsin sowie wenig ATP-Synthase mit einem sehr hohen Markierungsgrad in kleinen Vesikeln befindet, deren Lipidkomponente bei physiologischem pH-Wert eine möglichst geringe Pufferkapazität aufweist. In einem solchen System würde durch die hohe Konzentration von Bacteriorhodopsin ein großer pH-Gradient erzeugt, der durch eine hohe Konzentration von Indikator und durch eine niedrige Pufferkapazität des Systems empfindlich nachgewiesen werden könnte.

6.11.1 Korekonstitution großer Anteile an Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in Lipidvesikel

Für die Korekonstitution großer Anteile an Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase in Lipidvesikel ist die in *Middendorf (1996)* beschriebene Modifikation des Verfahrens nach *Rigaud et al. (1983)* nicht geeignet. Dieses Verfahren beruht darauf, daß die Lipidmembran der Vesikel durch den Zusatz des Detergens Triton X-100 destabilisiert wird und damit den Einbau der Proteine ermöglicht. Beim Einbau größerer Mengen solubilisierten Bacteriorhodopsins in die Lipidvesikel wird allein aus der Lösung des solubilisierten Bacteriorhodopsins so viel Triton X-100 in die Lösung eingetragen, daß die Vesikel vollständig solubilisiert werden. Nach der Entfernung des Detergens ergibt sich daraus eine Suspension, die sehr trüb ist und sich aufgrund der starken Lichtstreuung nicht für optische Messungen eignet.

Dagegen eignet sich eine Rekonstitution der Proteine in zwei Schritten, bei der zunächst nur das Bacteriorhodopsin rekonstituiert wird und im Anschluß an die Entfernung des Detergens die ATP-Synthase rekonstituiert wird. Der mittlere Radius der vorgefertigten Bacteriorhodopsin-Liposomen kann bei dieser Methode durch eine Behandlung der Suspension mit Ultraschall vor dem Einbau der ATP-Synthase verringert werden. Dies wirkt sich günstig auf die Lichtstreuung der Vesikelsuspension aus. Aus Titrationen der vorgefertigten Bacteriorhodopsin-Liposomen mit Triton X-100 kann aus dem Verlauf der optischen Dichte (Daten nicht dargestellt) geschlossen werden, daß diese Proteoliposomen schon bei einer geringeren Triton X-100-Konzentration solubilisiert werden, als dies

bei reinen Lipidvesikel der Fall ist (ca. 1 mg Triton X-100 pro 1 mg Lipid EPA/EPC 1:19). Zur Rekonstitution der ATP-Synthase in die vorgefertigten Bacteriorhodopsin-Liposomen wurde der Lösung daher nur soviel 10%iges Triton X-100 zugesetzt, daß sich eine Gesamtkonzentration von 0,5 mg Triton X-100 pro mg Lipid ergab. Der Erfolg der Rekonstitution wurde durch Messung der Aktivität der ATP-Synthase in den rekonstituierten Vesikel überprüft. Dazu wurde ATP-Synthase nach der Einschritt-Methode (Abschnitt 5.2.6; *Middendorf, 1996*) in Lipidvesikel und nach der Zweischnitt-Methode mit reduzierter Triton X-100-Konzentration in vorgefertigte Bacteriorhodopsin-Liposom mit Bacteriorhodopsin-Anteilen von 200, 400 und 600 BR pro Liposom rekonstituiert (1200, 600, 400 Lipide / BR). In alle vier Proben wurden 50 ATP-Synthasen pro Liposom eingebaut. Die Lipidphase der eingesetzten Liposomen bestand aus einem Gemisch von EPA mit EPC im Verhältnis 1:19. Die Aktivität der ATP-Synthase wurde mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Testsystems untersucht.

BR / Liposom -Verhältnis	0	200	400	600
relative ATP-Synthase-Aktivität / %	100	62	49	37

Tabelle 12: *Relative Aktivität der ATP-Synthase in Proteoliposomen mit unterschiedlichen Anteilen von Bacteriorhodopsin in den Liposomen. Die Aktivitäten der Proteoliposomen sind auf die Aktivität der Liposomen ohne Bacteriorhodopsin normiert.*

Die in Tabelle 12 dargestellten relativen Aktivitäten der rekonstituierten Proteoliposomen zeigen deutlich, daß mit dieser Methode Proteoliposomen mit sehr hohen Anteilen an Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase hergestellt werden können, bei denen die katalytische Aktivität der ATP-Synthase erhalten bleibt. Die nach dieser Methode gefertigten Proteoliposomen zeichnen sich außerdem durch eine geringe Trübung aus. Eine Abnahme der Aktivität der ATP-Synthase bei zunehmender Konzentration von Bacteriorhodopsin in der Membran, wie sie aus den dargestellten Meßwerten hervorgeht, ist auch schon von *Middendorf (1996)* beobachtet worden. Dabei ist jedoch unklar, ob es sich tatsächlich um eine verminderte Aktivität der ATP-Synthase handelt oder ob sich das Bacteriorhodopsin durch eine veränderte Membranpermeabilität auf das Testergebnis auswirkt.

6.11.2 Amplitude des Indikatorsignals

Um einen Eindruck von der Amplitude des zu erwartenden Indikatorsignals (Fluorescein gebunden an die ATP-Synthase) zu gewinnen, wurden drei verschiedene Proteoliposomen-Proben nach der oben dargestellten Methode hergestellt und das zeitaufgelöste Pumpsignal mit Pyranin in der wäßrigen Phase gemessen. Obwohl eine Messung des Protonentransfers mit Carboxyfluorescein der Untersuchung des Transfers von Protonen vom Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase näher kommen würde, wurde Pyranin gewählt. Bei 457 nm, der Wellenlänge bei der das Pyraninsignal gemessen wird, ist die Amplitude des Photozyklus kleiner als bei 490 nm. Das erhaltene Indikatorsignal ist damit mit einer geringeren Unsicherheit behaftet. Die Proben der Messungen hatten folgende Zusammensetzung:

- 20 % EPA, 80 % EPC, 600 BR und 50 ATP-Synthase / Liposom
- 5 % EPA, 95 % EPC, 1000 BR und 50 ATP-Synthase / Liposom
- 5 % EPA, 95 % EPC, 600 BR und 50 ATP-Synthase / Liposom

Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C in 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂ durchgeführt. Die Konzentrationen von Pyranin im Außenmedium betrugen 35 μ M. Die Proben wurden mit einer Lichtenergie von 25 mJ bei 532 nm angeregt (vgl. Abbildung 58). Der Zusatz von MgCl₂ in der Probe ist nötig, um die Stabilität der ATP-Synthase zu erhöhen.

	τ_{P1} / μ s	τ_{P2} / ms	A_{P1} / mOD	A_{P2} / mOD
20 % EPA, 80 % EPC, 600 BR	154	8,7	1,1	-1,4
5 % EPA, 95 % EPC, 1000 BR	152	15,8	1,3	-2,8
5 % EPA, 95 % EPC, 600 BR	169	17,9	1,4	-3,0

Tabelle 13: Zeitkonstanten und absolute Amplituden der Pyraninsignale der korekonstituierten Proteoliposomen aus Abbildung 58.

Aus den in Abbildung 58 dargestellten Pyraninsignalen und den in Tabelle 13 aufgeführten Zeitkonstanten und absoluten Amplituden aus einer Anpassung der Kurven geht hervor, daß sich für die Vesikel mit einem EPA-Anteil von 20 % ein kleineres Pumpsignal ergibt als für die anderen beiden Vesikelpräparationen. Die Ursache für diese Unterschiede in den Amplituden der Indikatorsignale ist vermutlich die höhere Pufferkapazität von EPA im Vergleich zu EPC. Für die beiden Proben mit einem 5 %igem EPA-Anteil in der Lipid-

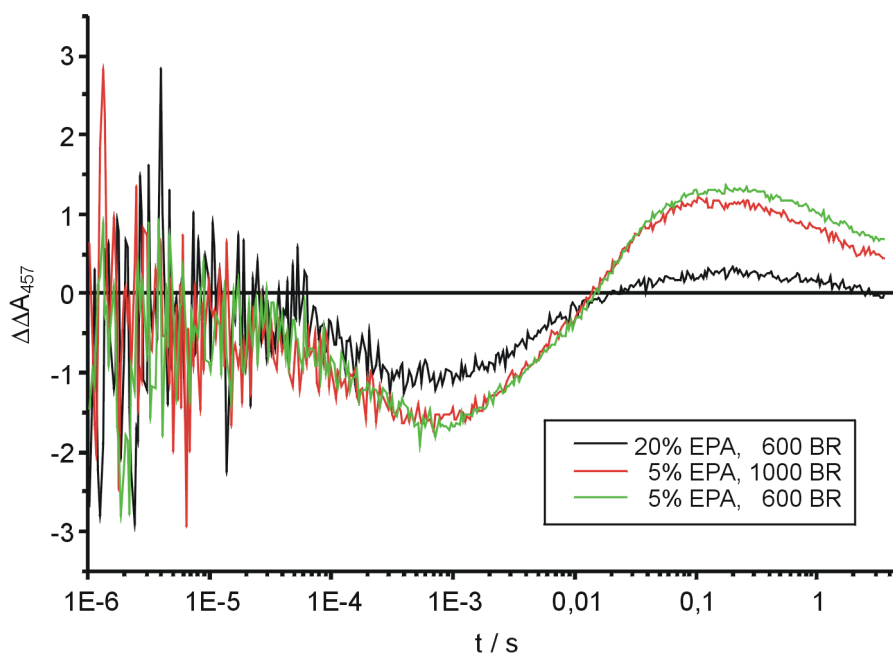


Abbildung 58: *Pyranin-Signale der korekonstituierten Proteoliposomen (150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20°C, 35 μM Pyranin im Außenmedium, pH 6,9).*

phase ergeben sich trotz der stark unterschiedlichen Anteile von rekonstituierten Bacteriorhodopsin praktisch gleiche Amplituden für das Pyraninsignal. Aus einer Anpassung der Signale ergeben sich für diese beiden Proben Werte für die Amplituden von 1,3 mOD und 1,4 mOD für die erste Phase des Signals (Abbildung 58, Zeitbereich 10^{-5} s bis 10^{-3} s) und -2,8 mOD bzw. -3,0 mOD für die zweite Phase des Signals (Zeitbereich 10^{-3} s bis 0,1 s). Die aus diesen Messungen ermittelten Zeitkonstanten τ_{P1} und τ_{P2} entsprechend in etwa den Zeitkonstanten, die für die Proteoliposomen mit variierenden Zusammensetzungen der Lipidphase in Abschnitt 6.10 gemessen wurden. Die Bacteriorhodopsin-Konzentration in den gemessenen Lösungen lag für die Präparationen mit 600 BR pro Liposom bei 4 μM und für die Präparation mit 1000 BR pro Liposom bei 6 μM.

Aufgrund der größeren pH-Sensitivität des Fluoresceins kann man für dieses Indikatorsignal mit Amplituden in der gleichen Größenordnung schon bei einer Konzentration von 20 μM erwarten. Aus den Mengenverhältnissen von Bacteriorhodopsin zur ATP-Synthase in den dargestellten Vesikeln ergibt sich, daß eine Fluorescein-Konzentration von 20 μM bei einem Markierungsgrad von 60 Fluorescein pro ATP-Synthase erreicht ist. Ein solch hoher Markierungsgrad an der ATP-Synthase kann aber nicht erreicht werden, da an der Oberfläche des Proteins nicht so viele Aminosäureseitenketten zur Verfügung stehen, die für eine Markierung genutzt werden können.

6.11.3 Markierung der korekonstituierten Vesikel

An den korekonstituierten Vesikeln mit einer Zusammensetzung der Lipidphase von 5 % EPA und 95 % EPC mit 600 BR und 50 ATP-Synthase wurden Markierungsversuche mit Fluoresceiniodacetamid (IAF) und Fluoresceinsuccinimidylester (Fsucc) durchgeführt. Dabei wurde nach der Vorschrift in Abschnitt 5.2.11 vorgegangen. Die Markierungen wurden jeweils bei Raumtemperatur mit einem 50- und 200fachen Überschuß des Fluoresceinderivates im Verhältnis zur ATP-Synthase bei Inkubationsdauern von 15 min und 2 h durchgeführt.

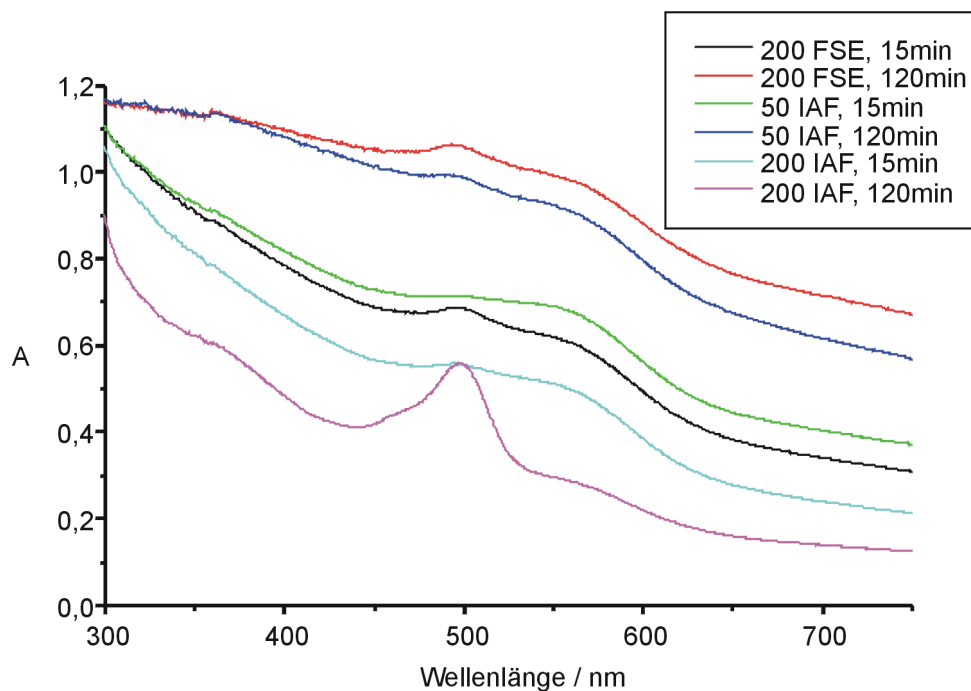


Abbildung 59: Absorptionsspektren korekonstituierter Proteoliposomen (50 ATP-Synthasen, 600 BR pro Liposom) bei pH 9,1 nach der Markierung mit den Fluoresceinderivaten IAF und Fsucc und anschließender Entfernung des überschüssigen Farbstoffs mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie.

Die Absorptionsspektren der Proben, die aus diesen Versuchen erhalten wurden, sind in Abbildung 59 dargestellt. Bei der Entfernung des überschüssigen Farbstoffs mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie wird die Probe in einem unbekannten Verhältnis mit dem Elutionspuffer verdünnt. Die Konzentration der Proteoliposomen in der Probe läßt sich

daher nach der Markierung nicht mehr berechnen. Auch eine Bestimmung der Konzentrationen anhand der Absorptionsbande des Bacteriorhodopsins ist erschwert, da diese von der Lichtstreuung der Vesikel nicht eindeutig zu trennen ist (vgl. Abbildung 59). Aus diesem Grund wurde der Markierungsgrad der ATP-Synthase nicht eingehender untersucht und auch nicht die Spezifität der Bindungsstellen für das Fluorescein. Sinn dieser Versuche war vielmehr festzustellen, ob es möglich ist, die ATP-Synthase in einem solchen Ausmaß mit Fluorescein zu markieren, daß Aussicht auf die Messung eines Indikatorsignals besteht. Wie die dargestellten Absorptionsspektren zeigen, läßt sich der Markierungsgrad der ATP-Synthase über einen sehr weiten Bereich variieren. Durch Markierungsversuche an Proteoliposomen, die Bacteriorhodopsin aber keine ATP-Synthase enthielten, konnte gezeigt werden, daß F_{succ} unter den gewählten Bedingungen auch an das Bacteriorhodopsin in den Lipidvesikel bindet.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, daß die Trübung aller Proben mit der Markierung zugenommen hat. Das Ausmaß der Zunahme der Trübung war bei den verschiedenen Proben unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein systematischer Zusammenhang mit den Markierungsbedingungen konnte dabei allerdings nicht festgestellt werden.

Die aus den Markierungsversuchen erhaltene Probe mit den besten optischen Eigenschaften ergab sich aus einer 2 h Inkubation mit einem 200fachen Überschuß von IAF (Abbildung 59, untere Linie). Für diese Probe kann aus dem Absorptionsspektrum eine Bacteriorhodopsinkonzentration von 0,8 μM und eine Fluoresceinkonzentration von 3,2 μM abgeschätzt werden. Daraus ergibt sich ein Markierungsgrad der ATP-Synthase von 50 Fluorescein / ATP-Synthase. Ein Vergleich dieser Konzentrationen mit denen für Bacteriorhodopsin und Pyranin im vorherigen Abschnitt (4 μM – 6 μM BR, 35 μM Pyranin) zeigt, daß auch bei dieser Probe in blitzlichtspektroskopischen Untersuchungen kein Indikatorsignal zu erwarten ist, welches sich eindeutig identifizieren läßt.

A Bedienung des Steuerprogramms

Die Aufnahme der transienten Absorptionsspektren und die Steuerung des Spektrometers erfolgen durch das DOS-basierte Steuerprogramm „F145.EXE“, welches von *Thiedemann, (1994)* entwickelt wurde und im Rahmen dieser Arbeit an die verwendeten Komponenten des Spektrometers angepaßt und erweitert wurde. Die Bedienung erfolgt per Mauszeiger und Tastatureingabe. Die Voreinstellungen beim Programmstart und einige wichtige Funktionen werden durch eine Konfigurationsdatei „TR.CFG“ kontrolliert, die sich im gleichen Verzeichnis befinden muß wie das Steuerprogramm. Die Konfigurationsdatei besteht aus einer Textdatei, in der die möglichen Einstellungen durch Kommentare erläutert sind. Das Auswählen der Abtastraten der einzelnen Segmente des Transientenrekorders ist nur durch eine Manipulation dieser Konfigurationsdatei möglich und nach dem Starten des Programms nicht mehr zu ändern. Um eine optimale Anpassung der Abtastraten an die verwendete logarithmische Zeitachse zu gewährleisten, können diese mit Hilfe des Programms „TIMES.EXE“ für eine beabsichtigte Gesamtaufnahmedauer berechnet werden.

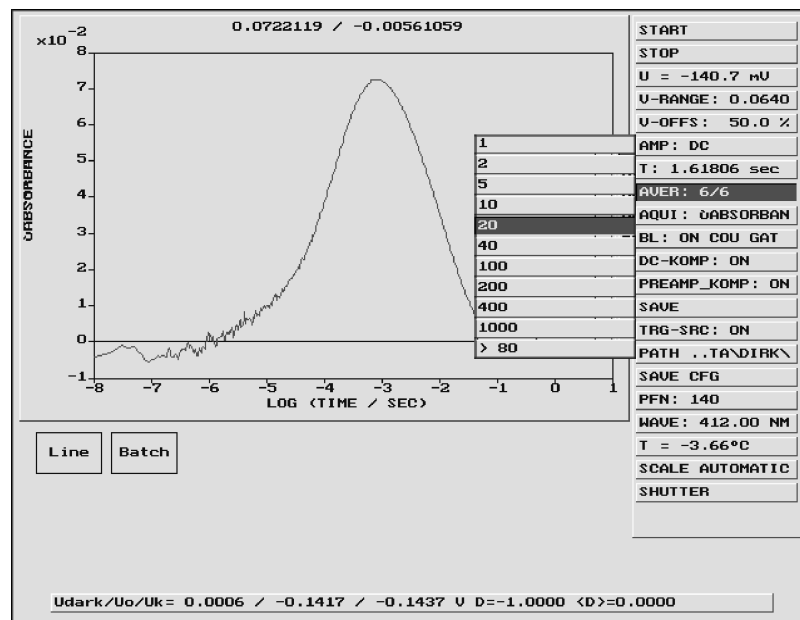


Abbildung 60: Graphische Oberfläche des Steuerprogramms für das Blitzlicht–Absorptionsspektrometer.

Im linken oberen Teil des Monitors wird die aktuelle transiente Absorptionsänderung

abgebildet. Das dargestellte Spektrum wird nach jedem Meßzyklus aktualisiert. Eine Anpassung der Ordinatenkalierung findet bei Einstellung der automatischen Skalierung nach jeweils fünf Meßzyklen statt. Oberhalb des Graphen werden die Extrema der Ordinate angezeigt.

Unterhalb des Graphen befinden sich die beiden Schaltflächen **Line** und **Batch**, mit denen das Programm textbasiert bzw. automatisch gesteuert werden kann. Beim Anwählen einer dieser Schaltflächen öffnet sich ein Feld, in dem die Eingaben vorgenommen werden können. Eingaben in dieses Feld werden mit der Return-Taste bestätigt.

Auf der rechten Seite befindet sich eine Menüleiste, mit der Einstellungen geändert, aktuell eingestellte Parameter angezeigt und die Messung gestartet werden kann. Selektierte Menüeinträge werden durch einen dunklen Hintergrund dargestellt. Gibt es zu einem Menüpunkt mehrere Einstellungsmöglichkeiten, so erscheint nach dem Anwählen des Menüeintrags ein Submenü mit den möglichen Parametern. In diesen Submenüs kann man eine Einstellung anwählen und die Auswahl durch erneutes Anwählen des Hauptmenüs bestätigen. Submenüeinträge, die mit dem „größer als“ Zeichen beginnen (>), können nach dem Anwählen über die Tastatur editiert werden. Die Eingabe wird mit der Return-Taste beendet.

A.1 Funktionen der Menüleiste

START: Starten der Aufnahme. Wurde vorher eine Messung abgebrochen, so kann mit Hilfe des Submenüs gewählt werden, ob die Messung fortgesetzt werden **CONTINUE** oder eine neue Messung begonnen werden soll **RESET**.

STOP: Stoppt die Messung nach dem nächsten abgeschlossenen Meßzyklus. Wird dieser Menüpunkt gewählt, während keine Messung läuft, so wird das Programm verlassen. Ist der Laser beim Beenden des Programms noch aktiv, wird dieser zunächst zum Abkühlen der Pumpkammer in den Standby-Modus geschaltet. Die Abschaltung erfolgt nach drei Minuten.

U = ...mV: Zeigt die am Transientenrekorder anliegende Eingangsspannung (Lichtsignal) in der Einheit mV an.

V--RANGE: Einstellen der Auflösung des Transientenrekorders (Einheit: mV). In einem erscheinenden Submenü sind einige Werte voreingestellt, der letzte Submenüeintrag ist editierbar. Entspricht ein eingegebener Parameter nicht den vom Transientenrekorder vorgegebenen Werten, wird auf den nächsten größeren möglichen Wert aufgerundet.

V--OFFSET: Einstellen der Kompensationsspannung in %. Der Zahlenwert gibt an, bei wieviel % des Auflösungsbereiches des Transientenrekorders sich die Ausgangsspannung U_0 befinden soll. Im Submenü sind einige Werte voreingestellt, der letzte Submenüeintrag ist editierbar.

AMP: Einstellen der Betriebsmodi des Eingangsverstärkers im Transientenrekorder. Mögliche Einstellungen:

DC: Gleichspannungskopplung des Verstärkers (Standardeinstellung).

AC: Wechspannungskopplung des Verstärkers.

BWL: Vorschalten eines Tiefpassfilters mit einer Eckfrequenz von ca. 20 MHz.

Z50: 50 Ω Eingangsimpedanz.

GND: Erdung des Verstärkereingangs.

T: Anzeige der Aufnahmedauer. Die Abtastraten des Transientenrekorders können nur vor dem Programmstart in der Konfigurationsdatei eingestellt werden.

AVER: Einstellen der Anzahl der Messungen, die gemittelt werden. Im Submenü sind einige Werte voreingestellt, der letzte Submenüeintrag ist editierbar.

AQUI: Einstellen des Darstellungsmodus. Mögliche Einstellungen:

VOLTAGE: Eingangsspannung am Transientenrekorder.

Δ TRANSMISSION: transiente Transmission.

Δ ABSORBANCE: transiente Absorption.

VRANGE: Darstellung des Signals im Abbildungsbereich des Transientenrekorders.

Ein aufgenommenes Signal wird beim Ändern des Darstellungsmodus nicht in den neuen Modus konvertiert. Auch ein Speichern der Daten in einem anderen als dem dargestellten Modus ist nicht möglich.

BL: Einstellen der Aufnahme einer Basislinie und deren optionaler Parameter:

ON: Die Aufnahme der Basislinie ist eingeschaltet.

OFF: Die Aufnahme der Basislinie ist ausgeschaltet, die Einstellung der nächsten drei Parameter ist unwirksam.

ONE BEFORE: Bei der Mittelung mehrerer Messungen wird nur einmal vor der ersten Messung eine Basislinie aufgenommen, die von allen weiteren Messungen subtrahiert wird.

COUPLED: Bei der Aufnahme der Basislinie wird der Photoverschluß im Anregungsstrahl geschlossen.

GATEMODE: Bei der Aufnahme der Basislinie wird ein Laser-Blitz emittiert und der Transientenrekorder durch das Triggersignal vom Laser gestartet.

DC--KOMP: Bei eingeschalteter Option wird die vor einer Meßreihe bestimmte Null-Spannung durch Anlegen dieser Spannung an den invertierenden Eingang des Transientenrekorders kompensiert.

PREAMP KOMP: Bei eingeschalteter Option wird vor jeder Meßreihe die Dunkelspannung von Photomultiplier und Vorverstärker bestimmt.

SAVE: Abspeichern einer Messung. **die Messungen werden nicht automatisch gespeichert!**. Im Hauptmenüeintrag **PATH** wird neben dem Laufwerk und dem Pfad auch der Name der Datei angegeben. Dem Namen wird beim Speichern eine dreistellige Zahl hinzugefügt, die nach dem Speichern inkrementiert wird. Mit Hilfe des Submenüs zu diesem Eintrag kann ausgewählt werden, ob dem Dateinamen diese inkrementierte Zahl angehängt wird oder ob eine andere Zahl verwendet werden soll, die anschließend wieder inkrementiert wird. Ist eine Aufnahme bereits gespeichert, erscheint im ersten Submenüeintrag: „is Saved“. Die Dateien erhalten immer die Endung „.DAT“.

TRG--SRC: Starten und Ausschalten des Lasers. Beim Selektieren des ersten Submenüeintrages wird der Laser gestartet, beim Deselektieren ausgeschaltet. In der Einstellung **Auto** wird der Laser beim Starten einer Messung eingeschaltet und nach dem Ende der Messung wieder ausgeschaltet.

PATH: Einstellen von Laufwerk, Pfad und Datei-Namen unter dem die Messung gespeichert wird (der Datei-Name sollte nur aus fünf Buchstaben bestehen, da das

Programm beim Speichern drei Ziffern an den Namen anhängt). Laufwerk und Pfad werden im MS-DOS-Format angegeben.

ENERGY: Anzeige der vom Energiemeter gemessenen Anregungsenergie. Dieser Menüpunkt ist nur aktiv, wenn die Messung der Anregungsenergie mit Hilfe der Kommandozeile aktiviert wurde.

PFN: Anzeige der gewählten PFN-Voltage (Laserenergie).

WAVE: Einstellen der Wellenlänge des Abtaststrahlenganges.

T =: Anzeige der Temperatur des Temperaturfühlers am Küvettenhalter.

SCALE: Einstellung der Skalierung der y-Achse. Bei der Submenüeinstellung „**AUTO**“ wird die Dimension der y-Achse nach jeweils fünf Meßzyklen auf das Signal angepaßt. Mit Hilfe der Submenüeinträge „**MIN**“ und „**MAX**“ kann die Achse manuell skaliert werden.

SHUTTER: Öffnen und Schließen der Photoverschlüsse. Beim Anwählen erscheint ein Submenü, in welchen der Verschluß des Anregungsstrahlenganges oder des Abtaststrahlenganges ausgewählt werden kann. Ein selektierter Submenüeintrag zeigt an, daß der Verschluß geöffnet ist. Durch Deselektieren des Submenüs kann der Verschluß geschlossen, durch Selektieren geöffnet werden.

A.2 Steuerung mit Hilfe der Kommandozeile

Durch Selektieren des Knopfes **Line** kann der Kommandozeileneditor geöffnet werden. Die Steuerung des Spektrometers geschieht durch Eingabe eines Kommandos mit evtl. dazugehörigen Parametern und anschließende Betätigung der „**Return**“-Taste. Die Steuerung kann dabei weiterhin parallel über die Menüleiste erfolgen.

Bei der Eingabe der Befehle wird nicht zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Rationale Zahlen als Parameter müssen mit einem Dezimalpunkt angegeben werden. Bei der nachfolgenden Beschreibung der Befehle steht ein „**x**“ für eine rationale Zahl als Parameter und „**n**“ für ganzzahlige Parameter. Die Parameter müssen durch einen Leerschritt voneinander und vom Kommando getrennt sein.

A.2.1 Befehle analog zur Menüleiste

AQUI ABS | TRANS | VRANGE | VOLT Einstellen des Darstellungsmodus.

AVERAGE n Einstellen der Anzahl der zu mittelnden Messungen.

CONTINUE Fortführen einer abgebrochenen Messung.

OFFSET x Einstellen Kompensationsspannung relativ zum Abbildungsbereich des Transientenrekorders.

SAVE {n} Abspeichern einer Messung. Mit Hilfe des optionalen Parameters kann die dreistellige Zahl n in den Dateinamen eingefügt werden. Ohne Angabe des Parameter wird die vorhergehende Zahl inkrementiert.

START Starten einer Messung.

VRANGE x Einstellen der Auflösung des Transientenrekorders.

WAVEL x Ändern der Wellenlänge des Abtaststrahls.

A.2.2 Erweiterte Befehle

ADSYNC n Zeitliches Verschieben des Triggersignals des Lasers relativ zur Emission des Laserstrahls. Die Werte für n können im Bereich von 0 bis 255 liegen.

AUTOSCALE Anpassen der Parameter „V--RANGE“ und „OFFSET“ an das Meßsignal. Zur Anpassung der Auflösung des Transientenrekorders an das Meßsignal wird zunächst eine Messung in geringer Auflösung ohne Basislinie aufgenommen. Aus dem Signalverlauf werden die Parameter für die Kompensationsspannung und die Spannungsauflösung des Transientenrekorders bestimmt. Der Zeitbereich $< 10^{-7}$ s wird dabei nicht berücksichtigt.

BEEP Ausgeben eines Signaltones und Unterbrechung bis zur Betätigung einer beliebigen Taste.

CALWL x Kalibrieren der beiden Monochromatoren auf die Wellenlänge x nm. Ohne den optionalen Parameter x werden die Monochromatoren auf eine Wellenlänge von 532 nm kalibriert. Die Monochromatoren werden auf die maximale Transmission in dem Bereich $x \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ eingestellt. Die Kalibrierung erfolgt durch Austausch des Notch-Filters gegen einen Bandpassfilter, auf dessen Transmissionsmaximum die Monochromatoren eingestellt werden.

DELAY n Zeitlicher Mindestabstand zwischen zwei Meßzyklen in s.

DOSIS x Einschalten und Empfindlichkeit der Energiemessung der Laserpulse. Der Parameter x muß zur korrekten Anzeige der Energie auf die am Energiemeter eingestellte Empfindlichkeit abgestimmt sein und wird in mJ/V angegeben. Für die beiden empfindlichsten Stufen des Energiemeters ist dieser Wert 1 mJ/V und für die beiden nächsten Stufen 10 mJ/V. Die Energie von Pulsen während der Aufnahme von Basislinien wird dabei nicht berücksichtigt.

DOSISOFF Ausschalten der Energiemessung.

ENERGY n Einstellen der emittierten Lichtenergie des Lasers. Sinnvolle Werte für n liegen im Bereich von 115 bis 150 (minimale bis maximale Energie des erzeugten Laserstrahls).

EXIT Verlassen des Kommandozeileneditors.

JULABOFF Ausschalten des Thermostaten.

JULABON Starten des Thermostaten.

LASEROFF Ausschalten des Lasers. Zur Abkühlung der Pulschammer wird der Laser noch drei Minuten im Standby-Modus betrieben.

MESSAGON Speichert die Dateien der Meßwerte zusätzlich im Verzeichnis „F:\DATAIN“ und schreibt den Status der laufenden Messung in die Datei „F:\MESSAGE“. Ist das Laufwerk „F:“ als Netzlaufwerk konfiguriert, so sind die Daten der Messungen sofort nach dem Abspeichern auf dem verbundenen Netzwerkrechner verfügbar. Mit Hilfe des Programmes „WATCHDOG.EXE“ läßt sich der Status der Messungen von einem Netzwerkrechner aus verfolgen und auf dem Monitor darstellen. Bei Fehlern während der Messung und bei deren Ende wird ein Signalton ausgegeben.

PREFLASH n {n} Auslösen von Laserpulsen direkt vor dem Beginn der Aufnahme. Der erste Parameter gibt an, wieviele Laserpulse vor dem die Aufnahme auslösenden Puls emittiert werden. Der zweite Parameter bestimmt den zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Pulsen in ms. Wird der zweite Parameter nicht angegeben, ist ein Intervall von 100 ms vorgegeben.

STIR n Rührintensität des Rührmotors unter dem Küvettenhalter. Für n können Werte von 0 (Rührmotor aus) bis 10 (höchste Rührintensität) angegeben werden.

TEMP x Einstellen der Vorgabe für die Badtemperatur des Thermostaten.

WAIT n Unterbrechen der Ausführung für n Sekunden.

WAITTEMP Warten, bis der Thermostat die vorgegebene Temperatur erreicht hat.

A.3 Steuerung mit Hilfe der Stapelverarbeitung

Durch Selektieren des Knopfes **Batch** kann das Spektrometer mit Hilfe einer Stapelverarbeitungsdatei gesteuert werden. Nach dem Betätigen des Knopfes erscheint eine Aufforderung zur Eingabe des Dateinamens der Stapelverarbeitungsdatei, der durch die „Return“-Taste bestätigt wird. Nach dem Laden der Datei erscheinen rechts von diesem Knopf drei weitere, mit denen die Stapelverarbeitung gestartet, abgebrochen und eine abgebrochene Verarbeitung fortgesetzt werden kann. Die Stapelverarbeitungsdatei ist eine Textdatei, die in jeder Zeile maximal ein Kommando enthält. Aber auch Leerzeilen sind zulässig. Alle in der Kommandozeile verfügbaren Anweisungen sind zulässig und unterliegen in einer Stapelverarbeitungsdatei der gleichen Syntax. Auch während der Stapelverarbeitung sind die Funktionen der Menüleiste verfügbar.

A.4 Format der Konfigurationsdatei

Beim Start sucht das Programm im eingestellten Verzeichnis nach der Konfigurationsdatei „tr.cfg“. Aus dieser Datei werden die Standardeinstellungen beim Programmstart geladen. Es ist nur durch Modifikationen dieser Datei möglich, die Anzahl der Punkte

auf der logarithmischen Zeitachse und die Abtastraten des Transientenrekorders zu bestimmen. Die Konfigurationsdatei gliedert sich in drei Abschnitte: Im ersten Abschnitt werden die Parameter des Verstärkers im Transientenrekorders eingestellt, im zweiten werden die Zeitbasen des Transientenrekorders festgelegt und im dritten Abschnitt kann das Verhalten des Programms voreingestellt werden. Die Einstellungen bestehen dabei aus einem Kodewort, gefolgt von einem Parameter. In die Datei können in geschweiften Klammern Kommentare eingefügt werden. Die Bedeutung der einzelnen Kodewörter in der Konfigurationsdatei und deren mögliche Parameter sind als Kommentare in der Konfigurationsdatei angegeben. Ein Beispiel für den Inhalt der Konfigurationsdatei mit Standardeinstellungen „tr.cfg“ ist in Abbildung 61 dargestellt.

A.5 Format der Ausgabedatei

Beim Speichern werden die Daten in einer Datei im ASCII-Format abgelegt. Der Beginn des Inhaltes einer solchen Datei ist in Abbildung 62 dargestellt. Der Pfad und die ersten fünf Buchstaben des Dateinamens werden im Steuerprogramm unter dem Menüeintrag Pfad eingestellt. Die letzten drei Buchstaben des Dateinamens bestehen aus einer Zahl, die nach jedem Speichern inkrementiert wird. Die Dateien erhalten immer die Endung „.DAT“. Die Dateien enthalten zwei Kopfzeilen, in denen wichtige Parameter der Messung aufgeführt sind. In der ersten Zeile stehen: Pfad und Dateiname, Wellenlänge, Anzahl der gemittelten Messungen, gemessene Temperatur des externen Temperaturfühlers, eingestellte Laserenergie und die vom Energiemeter gemessene Laserenergie. In der zweiten Zeile befinden sich die Anzahl der Meßpunkte, die ermittelte Dunkelspannung und die Null-Spannung. Ab der dritten Zeile befinden sich die Meßdaten in drei Spalten, die durch Kommata getrennt sind. In der ersten Spalte befindet sich die Zeitachse, in der zweiten die Meßpunkte und in der dritten Spalte die reziproke Wurzel der Anzahl der primären Meßpunkte, die zur Mittelung herangezogen wurden.

```

{

***** Verstaerker :
***** Verstarkermodus (Eingang), Messbereich, offset }
mode    { DC }                { erlaubt : Z50, DC, AC, BWL, GND }
offset  50 %                  { Nulllinie unten,mitte,oben bei 0,50,100 }
bereich .040 V                { von unten bis oben }

{***** Zeitbasis : Abtastrate tbi der Zeitbasis i in Hz
***** erlaubt 100E6 /2 /4 sowie /10 /25 /250 /2500 }
tb1  100.0E6  tb2   50.0E6   tb3   25.0E6   tb4   10.0E6
tb5   2.5E6   tb6    1.0E6   tb7  250.0E3   tb8  100.0E3

{ say } { *.cfg vom 07.4.93 mit neuem Zeug }

tpts 500 { points on s=lg(t) axis }
aver 16 { # of averaging          }
aqui  4 { aquisition 1:Volts 2:Trans 4:Abs 8:10bitDigits }
prea  2 { Preamplifier offsetkompensation 1:Off/No 2:On/Yes }
base 26 { Baseline 1:off 2:on 4:oncebefore 8:coupled 16:synchronized }
dcko  2 { dc kompensation with minus input 1:Off/No 2:On/Yes }
uref  2 { Referencevoltage for T,abs 2:baseline 1:postsignal 0:pretrigger }
trig  0 { Tiggersrc(LASER) (1:On) 2:Automatic }
datp  D:\DATA\ { first 50 characters significant }
wale -1. { wavelength in nm to be set by monochrometer OFF if negativ }

```

Abbildung 61: Beispiel für den Inhalt der Konfigurationsdatei „tr.cfg“ mit Standardeinstellungen.

B Meßwerte

B.1 Photozyklus und Protonentranslokation von Purpurchromophor der Bacteriorhodopsin-Mutante D36C

B.1.1 Photozykluskinetik


```

' D:\DATA\A001.DAT, Wl:412.00 nm, Av:16, T:30.99 C, PFN:136, Dosis: 9.81mJ
' 444, 0.000000, -0.118370
1.0000e-08,-3.04659e-03,2.500e-01
2.0000e-08,-2.01846e-03,2.500e-01
3.0000e-08,-2.05589e-03,2.500e-01
4.0000e-08,-3.82771e-03,2.500e-01
5.0000e-08,-1.62480e-03,2.500e-01
6.0000e-08,-1.69384e-03,2.500e-01
.
.
.

```

Abbildung 62: Beispiel für den Beginn des Inhalt einer Datei mit den Daten der transienten Absorptionsänderung.

	0,8 °C	9,6 °C	19,8 °C	29,7 °C	39,6 °C	49,6 °C	58,8 °C
$\tau_{M1} / \mu\text{s}$	5,09	3,01	1,39	0,94	0,49	0,45	0,28
$A_{M1} / \%$	-13,9	-13,2	-12,6	-11,9	-12,9	-15,4	-6,6
$\tau_{M2} / \mu\text{s}$	314,9	129,4	42,94	17,89	6,90	3,59	1,21
$A_{M2} / \%$	-34,1	-31,7	-27,0	-24,9	-20,7	-19,7	-27,3
$\tau_{M3} / \mu\text{s}$	1103,7	458,1	162,2	65,90	27,15	11,89	5,44
$A_{M3} / \%$	-59,1	-61,3	-66,4	-68,1	-72,6	-70,6	-67,1
τ_{M4} / ms	18,86	6,38	2,01	0,73	0,34	0,20	0,16
$A_{M4} / \%$	66,5	68,0	72,8	72,2	72,7	71,9	68,4
τ_{M5} / ms	69,94	23,05	7,71	2,98	1,64	1,12	0,89
$A_{M5} / \%$	32,9	31,6	26,7	27,3	26,7	27,5	30,8

Tabelle 14: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats der unmarkierten D36C-Mutante der Purpurmbranen in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

	0,5°C	10,3°C	15,5°C	20,6°C	25,0°C	30,0°C	35,4°C	40,2°C	50,1°C	60,1°C
$\tau_{M1}/\mu\text{s}$	5,15	3,29	2,16	1,70	0,91	0,70	0,62	0,65	0,19	0,33
$A_{M1}/\%$	-14,7	-12,6	-12,7	-13,6	-13,7	-13,5	-12,7	-11,6	-12,0	-15,7
$\tau_{M2}/\mu\text{s}$	214,9	74,33	45,93	28,14	13,44	9,80	4,69	2,99	1,96	0,99
$A_{M2}/\%$	-21,7	-19,2	-19,6	-18,1	-14,8	-15,2	-12,4	-11,6	-19,5	-16,8
$\tau_{M3}/\mu\text{s}$	841,5	302,9	184,5	112,9	68,55	45,63	28,91	20,08	9,90	4,40
$A_{M3}/\%$	-71,3	-73,2	-73,0	-73,9	-78,5	-77,8	-82,1	-81,9	-77,2	-74,3
τ_{M4}/ms	22,96	7,18	3,83	2,26	1,39	0,87	0,59	0,41	0,24	0,17
$A_{M4}/\%$	60,0	65,5	66,6	69,2	70,6	71,8	72,9	73,2	74,1	72,9
τ_{M5}/ms	169,3	60,34	32,81	20,63	13,48	8,73	5,94	4,24	2,51	1,66
$A_{M5}/\%$	38,3	33,1	32,0	29,8	28,3	27,3	26,2	25,8	25,1	26,7

Tabelle 15: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats der an Lysin 129 mit Fluorescein markierten D36C-Mutante der Purpurmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

	0,6 °C	9,9°C	14,9°C	20,1°C	24,8°C	30,0°C	35,2°C	40,0°C	50,0°C	59,6°C
$\tau_{M1}/\mu\text{s}$	6,18	2,99	2,01	1,35	1,18	0,61	0,67	0,46	0,67	0,08
$A_{M1}/\%$	-12,4	-12,5	-11,5	-12,4	-11,5	-11,7	-11,3	-13,5	-15,0	-19,3
$\tau_{M2}/\mu\text{s}$	345,0	130,1	78,79	47,36	28,34	18,75	12,82	8,36	4,03	1,24
$A_{M2}/\%$	-34,2	-28,6	-28,8	-26,3	-23,1	-27,0	-27,1	-26,3	-24,5	-32,9
$\tau_{M3}/\mu\text{s}$	944,3	366,6	228,4	136,4	89,91	60,49	39,86	27,87	12,58	5,13
$A_{M3}/\%$	-59,5	-65,2	-65,0	-67,4	-70,6	-67,2	-66,4	-66,5	-65,1	-64,1
τ_{M4}/ms	30,75	10,57	5,16	3,38	1,98	1,23	0,81	0,57	0,36	0,31
$A_{M4}/\%$	31,0	38,7	38,0	46,9	47,1	50,1	52,1	53,0	59,7	71,0
τ_{M5}/ms	131,5	43,90	22,44	13,75	8,12	5,10	3,32	2,33	1,48	1,40
$A_{M5}/\%$	68,1	60,7	61,5	52,7	52,7	49,5	47,5	46,4	39,5	28,6

Tabelle 16: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats der an Cystein 36 mit Fluorescein markierten D36C-Mutante der Purpurmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

B.1.2 Kinetik der Protonentranslokation

	0,5°C	10,3°C	15,5°C	20,6°C	25,0°C	30,0°C	35,4°C	40,2°C	50,1°C	60,1°C
$\tau_{F1,129}/\mu\text{s}$	396	289	185	126	97,7	74,7	49,6	44,1	24,0	25,3
$A_{F1,129}/\%$	-11,2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$\tau_{F2,129}/\text{ms}$	850	694	457	459	275	193	212	129	146	51,1
$A_{F2,129}/\%$	100	-24,1	-42,1	-43,6	-55,6	-56,4	-50,1	-58,6	-60,0	-72,6
$\tau_{F3,129}/\mu\text{s}$	189	61,4	38,6	22,5	18,2	11,8	8,80	6,54	4,23	3,23
$A_{F3,129}/\%$	-63,5	-55,1	-41,2	-39,4	-31,4	-31,8	-36,6	-35,5	-41,8	-40,5
$\tau_{F1,36}/\text{ms}$	778	388	296	221	162	143	104	84,1	46,5	31,8
$A_{F1,36}/\%$	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$\tau_{F2,36}/\text{ms}$	1860	1240	915	629	519	335	275	292	253	210
$A_{F2,36}/\%$	52,7	54,9	63,0	67,7	67,0	79,9	75,9	82,1	75,1	66,6
$\tau_{F3,36}/\text{ms}$	135	40,4	22,5	11,9	7,8	5,14	3,44	3,28	2,49	3,38
$A_{F3,36}/\%$	47,3	45,1	37,0	32,3	33,0	20,1	24,1	17,9	24,9	33,4
τ_{P1}/ms	1000	545		298		185		119	89,7	79,6
$A_{P1}/\%$	100	100		100				100	100	100
τ_{P2}/ms	59,9	23,4		6,86		2,72		1,46	1,01	0,57
$A_{P2}/\%$	100	100		100				100	100	100

Tabelle 17: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik der Protonierung von membrangebundenem Fluorescein an der extrazellulären ($\tau_{F,129}$) und zytoplasmatischen Seite ($\tau_{F,36}$) der Purpurmbran, sowie der Protonierung von Pyranin in der wässrigen Phase (τ_P) der D36C-Mutante der Purpurmbran in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

B.2 Photozyklus und Protonentranslokation an Papain-verdauter Purpurmembran

B.2.1 Photozykluskinetik

	0,4 °C	9,5 °C	19,7 °C	29,8 °C	40,0 °C	49,8 °C	59,0 °C
$\tau_{M1} / \mu\text{s}$	6,23	3,09	1,66	0,88	0,45	0,47	0,27
$A_{M1} / \%$	-13,2	-12,6	-12,6	-12,5	-14,7	-14,0	-12,1
$\tau_{M2} / \mu\text{s}$	341,5	122,2	41,36	17,13	8,63	3,51	1,35
$A_{M2} / \%$	-37,0	-31,1	-26,8	-26,5	-27,3	-24,7	-27,6
$\tau_{M3} / \mu\text{s}$	1084,2	414,9	148,4	60,26	27,76	12,33	5,92
$A_{M3} / \%$	-56,2	-62,2	-66,8	-66,6	-65,1	-67,4	-65,6
τ_{M4} / ms	25,12	8,19	2,71	0,95	0,40	0,25	0,18
$A_{M4} / \%$	54,7	59,8	70,9	72,1	68,2	71,3	64,4
τ_{M5} / ms	90,19	29,03	10,38	3,84	1,61	1,10	0,80
$A_{M5} / \%$	44,5	39,7	29,0	27,4	31,4	28,5	34,9

Tabelle 18: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats der Papain-verdauten, unmarkierten D36C-Mutante der Purpurmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

	0,9 °C	10,4 °C	15,5 °C	20,8 °C	25,8 °C	30,8 °C	35,7 °C	40,5 °C	50,3 °C
$\tau_{M1} / \mu\text{s}$	5,18	2,76	2,18	1,42	0,65	0,61	0,56	0,60	0,16
$A_{M1} / \%$	-15,0	-13,9	-12,7	-13,2	-13,8	-14,3	-12,9	-14,4	-10,5
$\tau_{M2} / \mu\text{s}$	179,1	62,7	47,4	24,3	13,2	9,76	5,90	5,29	1,95
$A_{M2} / \%$	-22,4	-19,1	-22,3	-18,3	-18,5	-19,5	-15,5	-16,1	-25,8
$\tau_{M3} / \mu\text{s}$	782,2	295,1	190,2	109,5	69,34	46,03	29,40	21,06	10,28
$A_{M3} / \%$	-68,9	-72,5	-69,1	-73,1	-75,2	-73,9	-77,4	-74,2	-71,3
τ_{M4} / ms	19,4	6,6	3,6	2,1	1,2	0,79	0,54	0,38	0,23
$A_{M4} / \%$	62,5	68,7	70,0	72,2	73,5	74,6	75,2	74,4	74,5
τ_{M5} / ms	126,3	48,9	27,2	16,8	10,8	7,35	5,06	3,53	2,10
$A_{M5} / \%$	36,0	30,2	29,0	26,9	25,9	24,7	23,9	24,6	25,0

Tabelle 19: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats der Papain-verdauten und an Lysin 129 mit Fluorescein markierten D36C-Mutante der Purpurmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

	1,0 °C	9,9 °C	15,1 °C	20,2 °C	24,9 °C	30,1 °C	35,3 °C	40,0 °C	50,0 °C
$\tau_{M1} / \mu\text{s}$	5,69	2,56	1,87	1,47	0,93	0,91	1,01	0,47	0,46
$A_{M1} / \%$	-12,3	-12,7	-11,9	-11,5	-12,3	-11,3	-10,4	-13,5	-15,9
$\tau_{M2} / \mu\text{s}$	327,1	120,7	81,05	47,46	28,80	20,33	13,95	8,98	3,75
$A_{M2} / \%$	-35,4	-27,4	-31,4	-28,1	-26,0	-29,2	-29,4	-32,2	-27,5
$\tau_{M3} / \mu\text{s}$	861,9	342,4	225,5	139,1	90,49	61,59	41,42	29,48	12,97
$A_{M3} / \%$	-58,2	-66,5	-62,1	-65,3	-67,9	-64,2	-63,1	-61,5	-63,5
τ_{M4} / ms	25,80	9,41	4,74	3,01	1,94	1,23	0,78	0,53	0,36
$A_{M4} / \%$	36,3	43,0	42,4	49,8	51,6	54,1	54,2	52,4	61,7
τ_{M5} / ms	105,8	36,66	19,17	11,56	7,13	4,52	2,88	1,97	1,31
$A_{M5} / \%$	63,0	56,5	57,1	49,9	48,0	45,4	45,5	47,0	38,2

Tabelle 20: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats der Papain-verdauten und an Cystein 36 mit Fluorescein markierten D36C-Mutante der Purpurmbranen in Abhängigkeit von der Temperatur (150 mM KCl, pH 6,9).

B.2.2 Kinetik der Protonentranslokation

	0,5 °C	10,3 °C	15,5 °C	20,6 °C	25 °C	30 °C	35,4 °C	40,2 °C	50,1 °C
$\tau_{F1,129} / \mu\text{s}$	681	229	159	103	76,9	54,2	41,5	35,2	38,9
$A_{F1,129} / \%$	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$\tau_{F2,129} / \text{ms}$	70,6	6,3	3,33	2,03	1,09	1,03	1,2	1,0	0,235
$A_{F2,129} / \%$	67,8	42,7	45,1	49,8	52,7	48,9	51,7	53,0	47,3
$\tau_{F3,129} / \text{ms}$	354	52,2	29,3	18,3	11,8	7,72	6,75	5,92	3,90
$A_{F3,129} / \%$	32,2	57,3	54,9	50,2	47,3	51,1	48,3	47,0	52,7
$\tau_{F1,36} / \mu\text{s}$	528	303	232	192	148	121	101	89,1	58,2
$A_{F1,36} / \%$	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$\tau_{F2,36} / \text{ms}$	4,69	2,57	1,58	0,778	0,756	0,448	0,269	0,147	0,159
$A_{F2,36} / \%$	41,8	46,1	43,7	41,7	35,2	31,1	34,4	48,2	29,1
$\tau_{F3,36} / \text{ms}$	65,5	23,3	11,1	6,57	4,93	3,16	2,23	1,69	1,13
$A_{F3,36} / \%$	58,2	53,9	56,3	58,3	64,8	68,9	65,6	51,8	70,9
$\tau_{P1} / \mu\text{s}$	3040	1000		318		119		45,3	40,3
$A_{P1} / \%$	100	100		100		100		100	100
τ_{P2} / ms	174	57,9		18,3		6,55		2,53	1,81
$A_{P2} / \%$	100	100		100		100		100	100

Tabelle 21: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik der Protonierung von membrangebundenem Fluorescein an der extrazellulären ($\tau_{F,129}$) und zytoplasmatischen Seite ($\tau_{F,36}$) der Purpurmembran, sowie der Protonierung von Pyranin in der wässrigen Phase (τ_P) der Papain-verdauten D36C-Mutante der Purpurmembran in Abhängigkeit von der Temperatur (150 M KCl, pH 6,9).

B.3 Photozyklus und Protonentranslokation an delipidierter Purpormembran

B.3.1 Photozykluskinetik

	Solubilisiert	Delipidiert * 1	Delipidiert * 2	Nativ
$\tau_{M1} / \mu s$	1,10	5,12	2,99	1,76
$A_{M1} / \%$	-34,3	-15,6	-19,0	-11,6
$\tau_{M2} / \mu s$	13,8	83,2	56,4	60,9
$A_{M2} / \%$	-54,4	-35,4	-37,1	-39,8
$\tau_{M3} / \mu s$	186,0	441,0	359,9	185,9
$A_{M3} / \%$	-12,7	-53,4	-50,9	-53,5
τ_{M4} / ms	6,81	24,9	10,4	2,09
$A_{M4} / \%$	59,6	29,0	20,6	25,4
τ_{M5} / ms	34,7	102,0	75,1	5,93
$A_{M5} / \%$	36,4	48,2	48,3	74,5
τ_{M6} / ms	397,6	526,1	492,9	
$A_{M6} / \%$	3,82	22,2	30,1	

Tabelle 22: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des *M*-Intermediats der delipidierten Purpormembranen, des solubilisierten BRs und nativer PM zum Vergleich (150 mM KCl, $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6,95).

B.3.2 Kinetik der Protonentranslokation

	Solubilisiert	Delipidiert * 1	Delipidiert * 2	Nativ
τ_{P1} / ms	0,081	3,62	4,82	1,05
$A_{P1} / \%$	100,0	100,0	100,0	100,0
τ_{P2} / ms	50,5	322,9	639,6	7,11
$A_{P2} / \%$	-89,0	-104,7	-110,3	97,3

Anpassung mit vier Exponentialtermen

$\tau_{P1} / \mu\text{s}$		661,9	395,3	
$A_{P1} / \%$		38,5	37,2	
τ_{P2} / ms		10,3	12,8	
$A_{P2} / \%$		61,5	62,8	
τ_{P3} / ms		203,1	323,3	
$A_{P3} / \%$		-77,5	-47,2	
τ_{P4} / ms		1101,1	941,7	
$A_{P4} / \%$		-21,2	-48,3	

Tabelle 23: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des Protonenaustausches mit der wässrigen Phase der delipidierten Purpurmbranen, des solubilisierten BR's und nativer PM zum Vergleich in (150 mM KCl, $T = 20^\circ\text{C}$, pH 6,95).

B.4 Photozyklus und Protonentranslokation an Bacteriorhodopsin in Lipidmembranen

B.4.1 Photozykluskinetik

	$\tau_{M1} / \mu\text{s}$ $A_{M1} / \%$	$\tau_{M2} / \mu\text{s}$ $A_{M2} / \%$	$\tau_{M3} / \mu\text{s}$ $A_{M3} / \%$	τ_{M4} / ms $A_{M4} / \%$	τ_{M5} / ms $A_{M5} / \%$
PM	0,889 −11,0	22,7 −27,8	74,2 −66,5	2,08 96,4	50,7 2,8
60 % PS, 40 % DMPC	0,565 −30,9	7,99 −79,0	979,9 12,4	6,11 62,5	22,7 25,2
40 % PS, 60 % DMPC	0,594 −27,8	7,33 −73,8	91,9 15,3	4,62 25,6	17,4 58,8
20 % PS, 80 % DMPC	0,826 −29,9	7,28 −72,8	70,1 20,7	5,29 14,9	24,7 64,2
100 % DMPC	0,411 −39,1	5,80 −76,9	65,9 17,2	8,14 14,3	41,4 68,2
10 % DMDAB, 90 % DMPC	0,868 −73,9	7,71 −61,1	97,9 10,3	14,9 16,0	56,3 73,2
20 % DMDAB, 80 % DMPC	0,358 −24,9	11,96 −52,5	1190,0 5,5	13,9 16,6	61,6 76,7
60 % DMPA, 40 % DMPC	0,539 −30,7	8,84 −46,9	41,5 −36,8	2,06 71,8	14,8 27,4
40 % DMPA, 60 % DMPC	0,697 −28,1	9,38 −73,9	524,6 10,0	4,68 44,0	16,5 45,7
20 % DMPA, 80 % DMPC	0,851 −11,0	7,27 −73,6	76,7 20,3	6,15 14,6	25,5 64,9

Tabelle 24: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Kinetik des M-Intermediats von BR in verschiedenen Lipidumgebungen (150 mM KCl, $T = 30^\circ\text{C}$, pH 6,95).

B.4.2 Kinetik der Protonentranslokation

	Meßreihe DA 13			Meßreihe DA 16		
	$\tau_{P1} / \mu\text{s}$	τ_{P2} / ms	τ_{P3} / ms	$\tau_{P1} / \mu\text{s}$	τ_{P2} / ms	τ_{P3} / ms
	$A_{P1} / \%$	$A_{P2} / \%$	$A_{P3} / \%$	$A_{P1} / \%$	$A_{P2} / \%$	$A_{P3} / \%$
60 % PS, 40 % DMPC	217,8 42,0	4,14 −109,2	50,3 51,5	230,0 75,3	6,17 −95,6	176,6 21,7
40 % PS, 60 % DMPC	158,2 44,6	7,68 −106,1	224,8 44,5	179,3 83,9	8,79 −96,6	130,7 14,
20 % PS, 80 % DMPC	100,6 51,7	11,9 −95,7	176,7 41,0	151,1 99,2	7,94 −70,0	63,1 −27,7
100 % DMPC	815,7 76,9	26,6 −134,4	449,0 23,1	125,5 97,6	12,6 −48,6	63,4 −50,7
10 % DMDAB, 90 % DMPC	386,7 69,2	42,7 −104,5	202,1 24,3	165,5 99,1	36,4 −49,4	79,0 −45,3
20 % DMDAB, 80 % DMPC	415,4 70,3	23,2 −111,5	357,1 27,9	165,5 99,1	36,4 −49,4	79,0 −45,3
60 % DMPA, 40 % DMPC	109,8 39,6	3,35 −104,7	21,6 59,8	189,7 79,2	4,04 −88,8	17,0 20,0
40 % DMPA, 60 % DMPC	108,6 33,0	4,91 −89,7	33,7 66,3	189,7 95,1	8,41 −88,8	581,3 4,4
20 % DMPA, 80 % DMPC	209,1 45,7	9,84 −117,8	58,4 49,4	135,7 99,8	8,54 −49,4	40,8 −46,6

Tabelle 25: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Protonierung und Deprotonierung von Pyranin in der wäßrigen Phase durch Proteoliposomen verschiedener Zusammensetzung bei einer KCl-Konzentration von 15 mM (15 mM KCl, $T = 30^\circ\text{C}$, pH 6,95).

	Meßreihe DA 13			Meßreihe DA 16		
	$\tau_{P1} / \mu\text{s}$ $A_{P1} / \%$	τ_{P2} / ms $A_{P2} / \%$	τ_{P3} / ms $A_{P3} / \%$	$\tau_{P1} / \mu\text{s}$ $A_{P1} / \%$	τ_{P2} / ms $A_{P2} / \%$	τ_{P3} / ms $A_{P3} / \%$
60 % PS, 40 % DMPC	181,0 62,7	6,71 −107,2	196,9 33,2	179,5 71,8	6,24 −108,2	496,0 25,7
40 % PS, 60 % DMPC	199,9 43,7	7,58 −108,0	346,1 44,7	207,9 72,3	7,44 −99,3	391,6 25,2
20 % PS, 80 % DMPC	204,9 43,4	11,7 −92,2	272,9 49,3	119,3 78,7	12,3 −91,2	436,9 18,4
100 % DMPC	630,0 42,9	27,9 −110,3	191,6 53,7	122,3 86,1	27,2 −87,1	943,9 10,5
10 % DMDAB, 90 % DMPC	232,6 27,5	56,7 −113,1	160,7 67,9	173,6 91,1	48,3 −108,8	1130 8,1
20 % DMDAB, 80 % DMPC	414,0 51,2	25,5 −107,9	306,4 44,0	137,3 78,0	133,7 −101,0	506,8 13,9
60 % DMPA, 40 % DMPC	337,9 54,1	2,67 −97,6	109,5 44,5	159,8 87,5	3,89 −99,6	73,8 12,5
40 % DMPA, 60 % DMPC	186,8 42,9	7,56 −96,4	171,8 56,7	193,9 88,3	5,91 −102,0	313,2 7,2
20 % DMPA, 80 % DMPC	75,3 −99,5	12,6 70,0	63,2 29,8	163,2 93,2	14,4 −99,9	1729 6,8

Tabelle 26: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Protonierung und Deprotonierung von Pyranin in der wäßrigen Phase durch Proteoliposomen verschiedener Zusammensetzung bei einer KCl-Konzentration von 150 mM (150 mM KCl, $T = 30^\circ\text{C}$, pH 6,95).

	Meßreihe DA 13			Meßreihe DA 16		
	$\tau_{P1}/\mu\text{s}$ $A_{P1}/\%$	τ_{P2}/ms $A_{P2}/\%$	τ_{P3}/ms $A_{P3}/\%$	$\tau_{P1}/\mu\text{s}$ $A_{P1}/\%$	τ_{P2}/ms $A_{P2}/\%$	τ_{P3}/ms $A_{P3}/\%$
60 % PS, 40 % DMPC	274,1 58,8	11,5 −90,1	941,3 40,4	208,0 81,8	9,81 −84,0	1044 9,9
40 % PS, 60 % DMPC	173,7 40,0	13,3 −124,8	1111 50,7	135,3 82,6	13,4 −103,0	3418 15,8
20 % PS, 80 % DMPC	199,5 44,2	17,1 −99,8	930,9 44,9	94,3 82,2	22,3 −90,5	11000 17,8
100 % DMPC	437,2 63,7	28,3 −107,1	809,0 34,2	66,9 93,6	38,8 −92,9	6748 5,2
10 % DMDAB, 90 % DMPC	298,3 50,1	28,7 −92,0	339,7 49,9	109,7 90,7	31,9 −92,4	12100 9,3
20 % DMDAB, 80 % DMPC	803,6 59,3	23,1 −114,3	602,4 34,8	145,1 80,6	33,9 −103,4	638,4 19,2
60 % DMPA, 40 % DMPC	154,3 57,9	2,06 −86,1	1807 42,1	157,9 79,6	4,27 −104,0	367,0 20,0
40 % DMPA, 60 % DMPC	80,8 58,0	5,39 −88,2	400,0 25,7	153,9 91,8	5,88 −99,6	3122 8,2
20 % DMPA, 80 % DMPC	13,4 78,2	1,63 −67,7	31,2 −19,1	422,8 98,5	34,7 −102,3	98,7 1,5

Tabelle 27: Zeitkonstanten und relative Amplituden der Protonierung und Deprotonierung von Pyranin in der wäßrigen Phase durch Proteoliposomen verschiedener Zusammensetzung bei einer KCl-Konzentration von 1 M (1 M KCl, $T = 30^\circ\text{C}$, pH 6,95).

C Komponenten des Blitzlichtspektrometers

Komponente	Bezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Computer	486DX2-66	EsCom
Digital-Analog-Konverter	DAC8	HMI, Berlin
Einbaurahmen		Frieske & Hoepfner
Energiedetektor	818J-25B	Newport, Darmstadt
Energiemeter	1825-C	Newport, Darmstadt
Hochspannungsnetzteil	PS310	Stanford Research, Gilching
IEEE-Interfacekarte	KPC-488	Keithley, Germering
Lampe	L2194-01	Hamamtsu Photonics Japan
Lampengehäuse	PowerArc A1010	PhotoMed, Wedel
Lampennetzteil	LPS-220	PhotoMed, Wedel
Laser	GCR130 - 10	Spectra Physics, Darmstadt
Laser-Linien-Polarisator	05BC16PC.3	Newport, Darmstadt
Lichtleiter		Hundt, Wetzlar
Linse		PhotoMed, Wedel
Monochromator	Modell 101	PhotoMed, Wedel
Notch-Plus-Filter	HNPF-532-1,0	L.O.T.-Oriel, Langenberg
pH-Elektrode	InLab [®] 423	Mettler-Toledo, Greifensee CH
pH-Meter	766	Knick, Berlin
Photomultipler	R928	Hamamatsu Photonics Japan
Photomultiplerschaltung		HMI Berlin
Photoverschluß	Compur electronic m	Prontor, Wildbad Schw.
Photoverschluß-Steuerung	Compur electronic m	Prontor, Wildbad Schw.
Polarisator	10LP-Vis	Newport, Darmstadt
Probenkammer	MP-1	PhotoMed, Wedel
Schrittmotorsteuerung	UD 5011	PhotoMed, Wedel
Schwanenhalslampe	KL1500 electronic	Schott, Mainz
Strahlteiler	BS532/45	Newport, Darmstadt
Thermostat	F20-MH	Julabo, Seelbach
Tisch	IsoStation VH3660-OPT	Newport, Darmstadt
Transientenrekorder	TR-AS 110	Dr. Strauss, Gundesheim
Vorverstärker	571	hms-electronic

Tabelle 28: Komponenten des Blitzlicht-Differenzabsorptionsspektrometers

D Literatur

Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R., Walker J.E. (1994) *Nature* **370**, 621 – 628.

Alexiev U., Marti T., Heyn M.P., Khorana H.G., Scherrer P. (1994a) *Biochemistry* **33**, 298 – 306.

Alexiev U., Marti T., Heyn M.P., Khorana H.G., Scherrer P. (1994b) *Biochemistry* **33**, 13693 – 13699.

Alexiev U., Mollaaghababa R., Scherrer P., Khorana H.G., Heyn M.P. (1995a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 372 – 376.

Alexiev U., Scherrer P., Marti T., Khorana H.G., Heyn M.P. (1995b) *FEBS Letters* **373**, 81 – 84.

Ames, Dubin, (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 769 – 775.

Arrio B., Johannin G., Volfin P., Lefort-Tran M., Packer L., Robinson A.E., Hrabeta E. (1986) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **246**, 185 – 191.

Barber J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **594**, 253 – 308.

Barnett S.M., Dracheva S., Hendler R.W., Levin I.W. (1996) *Biochemistry* **35**, 4558 – 4567.

Beyer H., Walter W. (1991) *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart.

Birge R.R. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* **1016**, 293 – 327.

Bousché O., Sonar S., Krebs M.P., Khorana H.G., Rothschild K.J. (1992) *Photochem. Photobiol.* **56**, 1085 – 1095.

Boucher F., Taneva S.G., Elouatik S., Déry M., Messaoudi S., Harvey-Girard E., Beaudoin N. (1996) *Biophys. J.* **70**, 948 – 961.

Boyer P.D., Chance B., Ernster P., Mitchell P., Racker E., Slater E.C. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 955 – 1026.

- Burghaus P.A., Dencher N.A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 395 – 409.
- Butt H.-J., Fendler K., Bamberg E., Tittor J., Oesterheld D. (1989) *EMBO* **8**, 1657 – 1663.
- Cao Y., Brown S.L., Needleman R., Lanyi J.K. (1993) *Biochemistry* **32**, 10239 – 10248.
- Cao Y., Brown L.S., Sasaki J., Maeda A., Needleman R., Lanyi J.K. (1995) *Biophys. J.* **68**, 1518 – 1530.
- Cevc G. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 311 – 382.
- Checover S., Nachliel E., Dencher N.A., Gutman M. (1997) *Biochemistry* **45**, 13919 – 13928.
- Cooper T.G. (1981) *Biochemische Arbeitsmethoden*, W. de Gruyter, Berlin.
- Dancsházy Z., Tokaji Z. (1993) *Biophys. J.* **65**, 823 – 831.
- Dencher N.A. (1983) *Photochem. Photobiol.* **38**, 753 – 767
- Dencher N.A., Dresselhaus D., Zaccai G., Büldt G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7876 – 7879.
- Dencher N.A., Heyn M.P. (1979) *FEBS Lett.* **108**, 307 – 310.
- Dencher N.A., Papadopoulos G., Dresselhaus D., Büldt G. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1026**, 51 – 56.
- Dencher N.A., Wilms M. (1975) *Biophys. Struct. Mechanism* **1**, 259 – 271.
- Diller R., Stockburger M. (1988) *Biochemistry* **27**, 7641 – 7651.
- Druckmann S., Ottolenghi M., Pande A., Pande J., Callender R.H. (1982) *Biochemistry* **21**, 4953 – 4959.
- Dunn, R. J., Hackett, N. R., McCoy, J. M., Chao, B. H., Kimura, K., Khorana, H. G. (1981) *J. Biol. Chem.*, **262**, 9246 – 9254.
- Engelbrecht S., Junge W. (1997) *FEBS Letters* **413**, 485 – 491.
- Fischer U., Oesterheld D. (1979) *Biophys. J.* **28**, 211 – 230.

- Fimmel S. (1989) *Dissertation*, „Strukturuntersuchungen an Bacteriorhodopsin durch Verdauungsexperimente mit Proteasen und Röntgendiffraktion“ Freie Universität Berlin.
- Fimmel S., Choli T., Dencher N.A., Büldt G., Wittmann-Liebold B. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **978**, 231 – 240.
- Fitter, J., Lechner, R. E., Dencher, N. A. (1997) *Biophys. J.* **73**, 2126 – 2137.
- Fitter, J., Lechner, R. E., Dencher, N. A. (1997) *Biological Macromolecular Dynamics, Academic Press*, 123-127.
- Fromme P., Boekema E.J., Gräber P. (1987) *Z. Naturforsch.* **42**, 1239 – 1245.
- Gabriel B., Pratts M., Teissié J. (1996) *Biochim. et Biophys. Acta* **1186**, 172 – 176.
- Gabriel B., Teissié J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14521 – 14525.
- Gerwert K., Hess B., Soppa J., Oesterhelt D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4943 – 4949.
- Glaeser R.M., Stubb J.S., Henderson R. (1985) *Biophys. J.* **48**, 775 – 780.
- Govindjee R., Imasheva E.S., Misra S., Balashov S.P., Ebrey T.G., Chen N., Menick D.R., Crouch R.K. (1997) *Biophys. J.* **72**, 886 – 898.
- Govindjee R., Ohno K., Ebrey T.G. (1982) *Biophys. J.* **38**, 85 – 87.
- Grigorieff N., Ceska T.A., Downing K.H., Baldwin J.M., Henderson R. (1996) *J. Mol. Biol.* **259**, 393 – 421.
- Grzesiek S., Dencher N.A. (1986) *Biophys. J.* **50**, 265 – 276.
- Grzesiek S., Dencher N.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9509 – 9513.
- Gutman M. (1986) *Methods in Enzymology* **127**, 522 – 538.
- Gutman M., Nachliel E. (1995) *Biochim Biophys Acta* **1231**, 123 – 138.
- Görg A., Postel W., Westmaier R. (1978) *Anal. Biochem.* **89**, 60 – 70.
- Hartree E.F. (1972) *Anal. Biochem.* **48**, 422 – 427.

Haugland R.P. (1996) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Eugene (USA).

Heberle J. (1991) *Dissertation*, „Zeitauflösende Untersuchung der Protonentranslokationsschritte von Bakteriorhodopsin mittels chemisch-gekoppelter pH-Indikatoren“ Freie Universität Berlin.

Heberle J., Dencher N.A. (1990) *FEBS Lett.* **277**, 277 – 280.

Heberle J., Dencher N.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5996 – 6000.

Heberle J., Riesle J., Thiedemann G., Oesterhelt D., Dencher N.A. (1994) *Nature* **370**, 379 – 382.

Heberle J., Oesterhelt D., Dencher N.A. (1993) *EMBO J.* **12**, 3721 – 3729.

Holloway P.W. (1973) *Anal. Biochem.* **53**, 304 – 308.

Hufnagel, P., Schweiger, U., Eckerskorn, C., Oesterhelt, D. (1996) *Biophys. J.* **70**, A110.

Kano K., Fendler J.H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **509**, 289 – 299.

Kates M., Kushwaha S.C., Sprott G.D. (1982) *Methods in Enzymology* **88**, 98 – 111.

Kell D.R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 55 – 99.

Khorana H. G., Gerber, G. E., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Anderegg, R. J., Nihel, K., Biemann, K. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5046 – 5050.

Kimura Y., Vassilyev D.G., Miyazawa A., Kidera A., Matsushima M., Mitsuoka K., Murata K., Hirai T., Fujiyoshi Y. (1997) *Nature* **389**, 206 – 211.

Koch M.H.J., Dencher N.A., Oesterhelt D., Plöhn H.-J., Rapp G, Büldt G. (1991) *EMBO J.* **10**, 521 – 526.

Krebs M.P., Khorana H.G. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 1555 – 1560.

Laemmli U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.

Lanyi J.K. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 241 – 261.

Lanyi J.K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31209 – 31212.

- Lanyi J.K. (1998) *J. Struct. Biol.* **124**, 164 – 178.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Ludmann K., Gergely C., Váró G. (1998) *Biophys. J.* **75**, 3110 – 3119.
- Luecke H., Richter H.-T., Lanyi J.K. (1998) *Science* **280**, 1934 – 1940.
- Mathies R.A., Lin S.W., Ames J.B., Pollard W. T. (1991) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 491 – 518.
- McCarty R.E., Hammes G.G. (1987) *Trends in Biochemical Sciences* **12**, 234 – 237.
- McLaughlin S. (1977) *Curr. Topics Memb. Transp.* **9**, 71 – 144.
- McLaughlin S. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 113 – 136.
- Middendorf K. (1997) *Dissertation*, „Selektive Markierung der Chloroplasten-ATP-Synthase mit dem pH-sensitiven optischen Indikator Fluorescein und Charakterisierung korekonstituierter Proteoliposomen aus Bacteriorhodopsin und ATP-Synthase“ Technische Hochschule Darmstadt.
- Mitchel P. (1961) *Nature* **191**, 144 – 148.
- Nachliel E., Gutman M. (1996) *FEBS Letters* **393**, 221 – 225.
- Nachliel E., Gutman M., Kiryati S., Dencher N.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10747 – 10752.
- Nagel G., Kelety B., Möckel B., Büldt G., Bamberg E. (1998) *Biophys J.* **74**, 403 – 412.
- Neff D., (1997) *Dissertation*, „Isolation und Charakterisierung des membranintegralen Komplexes CF₀F₁ der ATP-Synthase aus Chloroplasten mit biochemischen und biophysikalischen Methoden“ Technische Hochschule Darmstadt.
- Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K. Jr. (1997) *Nature* **386**, 299 – 302.
- Norrish R.G.W., Porter G. (1950) *Nature* **164**, 685.
- Oakely B.R., Kirch D.R., Morris N.R., (1980) *Anal. Biochem.* **105**, 361 – 363.

- Oesterhelt D. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 489 – 500.
- Oesterhelt D., Tittor J., Bamberg E. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 181 – 191.
- Ort D.R., Parson W.W. (1979) *Biophys. J.* **25** 341 – 354.
- Otto H., Marti T., Holz M., Mogi T., Lindau M., Khorana H.G., Heyn M.P. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9228 – 9232.
- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., Kiselev, M., Kiselev, A. V., Lobanov, N., Nasimov, I. (1978) *Bioorg. Chem.* **4**, 1573-1574.
- Ablonczy Z., Ha V.H., Papp E. *Biophys. Chem.* **71**, 235 – 243.
- Pebay-Peyroula E., Rummel G., Rosenbusch J.P., Landau E.M. (1997) *Science* **277**, 1676 – 1681.
- Pick U., Racker E. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 2793 – 2799.
- Renthal R., Harris G.J., Parrish R. (1979) *Biochim. Biophys Acta* **547** 258 – 269.
- Renthal R., McMillan K., Guerra L., Garcia M.N., Rangel R., Jen C.-M. (1995) *Biochemistry* **34** 7869 – 7979.
- Richard P. (1991) Dissertation Technische Universität Berlin.
- Riesle J., Oesterhelt D., Dencher N.A., Heberle J. (1996) *Biochemistry* **35**, 6635 – 6643.
- Rigaud J.-L., Bluzat S., Buschlen S. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **111**, 373 – 382.
- Rodiguin N.M., Rodiguina E.N. (1980) *Consecutive Chemical Reactions*, D. van Nostrand Co. Inc., Princeton, USA.
- Sabbert D., Engelbrecht S., Junge W. (1996) *Nature* **381**, 623 – 625.
- Saß H.J., Schachowa I.W., Rapp G., Koch M.H.J., Oesterhelt D., Dencher N.A., Büldt G. (1997) *EMBO J.* **16**, 1484 – 1491.
- Scherrer P., Alexiev U., Marti T., Khorana H.G., Heyn M.P. (1994) *Biochemistry* **33**, 13684 – 13692.
- Scherrer P., Mathew M.K., Sperling W., Stoeckenius W. (1989) *Biochemistry* **28**, 829 – 834.

- Schmid M. (1996) *Diplomarbeit*, „Laser-Blitzlichtspektroskopie an Oberflächen-modifiziertem Bacteriorhodopsin“ Technische Hochschule Darmstadt.
- Schulten K., Tavan P. (1978) *Nature* **272**, 85 – 86.
- Seigneuret M., Rigaud J.L. (1985) *FEBS Letters* **188**, 101 – 106.
- Stockenius W. (1994) *J. Membr. Biol.* **139**, 139 – 148.
- Stockenius W. (1999) *Protein. Sci.* **8**, 447 – 459.
- Sperling W., Carl P., Rafferty C.N., Dencher N.A. (1977) *Biophys. Struct. Mech.* **3**, 79 – 94.
- Seigneuret M., Rigaud J.L., (1988) *FEBS Letters* **228**, 79 – 84.
- Stryer L. (1990) *Biochemie*, Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg.
- Szoka F., Olson F., Heath T., Vail W., Mayhew E., Papahadjopoulos D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 559 – 571.
- Szundi I., Stoeckeninius W. (1988) *Biophys. J.* **54**, 227 – 232.
- Szundi I., Stoeckeninius W. (1989) *Biophys. J.* **56**, 369 – 383.
- Thiedemann, G. (1994) *Dissertation*, „Zeitaufgelöste optische Spektroskopie an Bacteriorhodopsin: Photozyklusintermediate, Einfluß von Wasser“ FU Berlin.
- Tokaji Z. (1995) *Biophys. J.* **65**, 1130 – 1134.
- Váró G., Lanyi J.K. (1995) *Biochemistry* **34**, 12161 – 12169.
- Váró G., Needleman R., Lanyi J.K. (1996) *Biophys. J.* **70**, 461 – 467.
- Verclas S.A.W. (1998) *Dissertation*, „Struktur- und Funktionsuntersuchungen an den Membranproteinen Bacteriorhodopsin und Chloroplasten- F_0F_1 -ATP-Synthase“ Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Walz D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 171 – 224.
- Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.

Williams R.P.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 1 – 44.

Wolfbeis O.S., Furlinger E., Kroneis H., Marsoner H. (1983) *Z. Anal. Chem.* **314**, 119-124.

Yoshino A., Yoshido T., Takahashi K. (1989) *Magn. Res. Chem.* **27**, 344 – 347.